

MAFALDA SOFIA DE MELO MOITA

**ESTUDO RETROSPECTIVO DAS DOENÇAS
TRANSMITIDAS POR VECTORES – BABESIOSE,
EHRlichIOSE, RICKETTSIOSE E LEISHMANIOSE – EM
CÃES NO CONCELHO DE CASCAIS**

Orientador: Doutor Pedro Faísca

Co-orientador: Dra. Odete Almeida

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2012

MAFALDA SOFIA DE MELO MOITA

**ESTUDO RETROSPECTIVO DAS DOENÇAS
TRANSMITIDAS POR VECTORES – BABESIOSE,
EHRlichIOSE, RICKETTSIOSE E LEISHMANIOSE – EM
CÃES DO CONCELHO DE CASCAIS**

**Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de
Mestre em Medicina Veterinária conferido pela
Universidade Lusófona de Humanidades e
Tecnologias**

Orientador: Doutor Pedro Faísca

Co-orientador: Dra. Odete Almeida

Responsável externo: Dra. Liliana Fernandes

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2012

Agradecimentos

Quero agradecer em primeiro lugar aos meus pais e avós, por todo o apoio que me deram ao longo da minha vida e por sempre acreditarem. Sem vocês nada disto seria possível.

À Dra. Liliana Fernandes, por me orientar no meu estágio e pelos conhecimentos transmitidos ao longo deste tempo.

À Dra. Ana Vieira, Dra. Vanessa Grosso, Dra. Telma Almeida, ao Dr. António Vieira por toda a ajuda e apoio durante o estágio. E a toda a equipa da Clínica Veterinária de Cascais.

Ao João, por me teres aturado em alguns momentos menos bons e por tudo o que és para mim.

Aos meus amigos, especialmente à Fernanda, Raquel, André e Margarida, por todos os bons momentos que passámos e por tudo o que aprendemos juntos.

À Prof. Odete Almeida e ao Prof. Dr. Pedro Faísca, por toda a disponibilidade que demonstraram na realização desta dissertação, mas também pelos conhecimentos transmitidos ao longo do curso. Ao Dr. Mauro Bragança, por me ter ajudado com toda a parte de estatística.

Resumo

As doenças transmitidas por vectores ocorrem pela picada, nomeadamente de mosquitos, flebótomos, ixodídeos e pulgas podem ser causadas por parasitas, bactérias ou vírus. Para além de algumas apresentarem prevalências elevadas e/ou serem endémicas, têm importância acrescida por muitas serem zoonoses.

Nos últimos anos, tem havido uma emergência ou reemergência de algumas doenças, e muitas associadas a alterações epidemiológicas, sobretudo na sua expansão geográfica. Vários factores afectaram este fenómeno, especialmente o aumento da temperatura, que leva à alteração do microclima, biologia e comportamentos alimentares dos vectores, bem como as viagens de animais para zonas endémicas e a sua importação destas zonas.

O objectivo do presente estudo foi conhecer e caracterizar a existência de doenças transmitidas por vectores no cão, numa clínica veterinária em Cascais, onde foram recolhidos dados retrospectivamente de 1 de Janeiro de 2010 e 29 de Fevereiro de 2012, e relacionou-se o seu diagnóstico com possíveis factores de risco, como a idade, a época do ano, sexo e raça. A amostra foi obtida através da base de dados da clínica, tendo sido analisados 42 cães com suspeita de Babesiose, 43 de Ehrlichiose, 46 de Rickettsiose e 190 de Leishmaniose.

A Leishmaniose Canina foi a infecção com maior número de casos positivos, 53 em 190 (28%), seguida da Rickettsiose Canina com 40 em 46 (87%). A Babesiose apresentou apenas 8 casos em 42 (19%) e Ehrlichiose com 4 em 43 (9%). Foram também verificadas co-infecções entre *Rickettsia conorii* e *Ehrlichia canis* (n=4), *Rickettsia conorii* e *Babesia canis* (n=8) e *Leishmania infantum* e *Rickettsia conorii* (n=2). Os factores analisados não revelaram diferenças estatisticamente significativas no diagnóstico destes agentes.

Palavras-chave: Doenças transmitidas por Vectores, Cão, Cascais, Portugal

Abstract

Vector borne diseases, caused by parasites, bacterias or viruses can be transmitted by mosquitoes, sandflies, fleas and tick bites. The prevalence of these diseases is increasing, and some of them have a zoonotic character, which strengthen their importance.

The aim of this study was to determine and characterize vector borne diseases in dogs, at a Veterinary Clinic located in Cascais (Portugal).

A retrospective study was conducted, comparing vector borne diseases diagnosis with possible risk factors, such as age, time of year, sex and breed, in that particular geographic location, during the period of 1 January 2010 to 29 February 2012.

There were a total of 207 patients of dogs who presented signs compatible with vector borne diseases: 42 suspected of Babesiosis, 43 suspected of Ehrlichiosis, 46 canine Rickettsiosis and 190 suspected of Leishmaniosis.

It was concluded that in the area covered by this study, the elected factors didn't have any statistic correlation with the positive diagnosis. It was also determined that Leishmaniasis had a bigger onset of positive cases, 53 out of 190 (28%), Rickettsiosis had 40 out 46 (87%), Babesiosis, 8 out of 42, (19%) and Ehrlichiosis, 4 out of 43, 9%.

Key-words: Vector borne diseases, Dog, Cascais, Portugal

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

A. phagocytophilum – *Anaplasma phagocytophilum*

A. platys – *Anaplasma platys*

B. canis – *Babesia canis*

DGS - Direcção Geral de Saúde

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA - acrónimo do inglês "Enzyme-linked immunosorbent assay"

E. canis – *Ehrlichia canis*

EUA – Estados Unidos da América

IFI – Imunofluorescência indirecta

IgG 1 – Imunoglobulina G 1

IgG 2 – Imunoglobulina G 2

IL- 2 – Interleucina 2

IFN- α – Interferão α

LC - Leishmaniose Canina

L. infantum – *Leishmania infantum*

OIE – World Organisation for Animal Health

PCR - Reacção em cadeia de polimerase, sigla anglo-saxónica de "polymerase chain reaction"

qPCR - Reacção em cadeia de polimerase quantitativa, sigla anglo-saxónica de "quantitative polymerase chain reaction"

P. ariasi - *Phlebotomus ariasi*

P. perniciosus - *Phlebotomus perniciosus*

R. conorii – *Rickettsia conorii*

R. sanguineus – *Rhipicephalus sanguineus*

WHO – World Health Organisation

% - Percentagem

Índice

Introdução.....	11
1.1. Babesiose Canina	11
1.1.1. Taxonomia	11
1.1.2. Etiologia	12
1.1.3. Transmissão e ciclo de vida da <i>Babesia</i> spp.....	12
1.1.4. Patogenia e sintomatologia.....	13
1.1.5. Distribuição Babesiose Canina	14
1.1.6. Factores de risco	18
1.1.7. Diagnóstico	18
1.2. Ehrlichiose Canina.....	19
1.2.1. Taxonomia	19
1.2.2. <i>Ehrlichia canis</i> – Ehrlichiose Monocítica Canina	19
1.2.3.1. Etiologia	19
1.2.3.2. Transmissão e ciclo de vida	20
1.2.3.3. Patogenia e sintomatologia	20
1.2.3.4. Distribuição mundial	21
1.2.3.5. Epidemiologia em Portugal.....	22
1.2.3.6. Factores de risco	23
1.3. Rickettsiose Canina.....	24
1.3.1. Taxonomia	24
1.3.2. Etiologia	24
1.3.3. Transmissão e ciclo de vida da <i>Rickettsia</i> spp	24
1.3.4. Patogenia e sintomatologia.....	25
1.3.5. O vector e os hospedeiros	25
1.3.6. Distribuição mundial.....	26
1.3.7. Epidemiologia em Portugal	27
1.3.8. Factores de risco	28
1.3.9. Diagnóstico	29
1.3.10. Importância Zoonótica	29
1.4. Leishmaniose Canina	30
1.4.1. Taxonomia	30
1.4.2. Etiologia	30
1.4.3. Distribuição Mundial	30

1.4.4.	Leishmaniose Canina em Portugal	32
1.4.5.	Biologia e Epidemiologia do vector	34
1.4.6.	Transmissão e patogenia	37
1.4.7.	Ciclo de vida	38
1.4.8.	O cão como hospedeiro reservatório	38
1.4.9.	Outros hospedeiros reservatórios	39
1.4.10.	Factores de risco	40
1.4.11.	Sinais clínicos	40
1.4.12.	Diagnóstico	41
1.4.12.1.	Diagnóstico Parasitológico	41
1.4.12.2.	Diagnóstico Serológico	41
1.4.12.3.	Diagnóstico Molecular	42
1.4.12.4.	Outros métodos de diagnóstico	44
1.4.13.	Importância zoonótica em Portugal	44
1.5.	Breve revisão sobre os ixodídeos existentes em Portugal	44
1.5.1.	Ixodídeos existentes em Portugal	45
1.5.2.1.	Género <i>Rhipicephalus</i>	45
1.5.2.2.	Género <i>Ixodes</i>	46
1.5.2.3.	Género <i>Dermacentor</i>	46
1.6.	Co – Infecções	47
1.7.	Outras doenças transmitidas por vectores existentes em Portugal	47
1.8.	Objectivos	48
2.	Material e Métodos	49
2.1.	Método Analítico	49
2.2.	Limiar da Positividade da técnica IFI	49
2.3.	Análise estatística	49
3.	Resultados	51
3.1.	Avaliação Global	51
3.1.1.	Percentagem de canídeos suspeitos positivos	51
3.1.2.	Idade	52
3.1.3.	Época	52
3.1.4.	Género	54
3.1.5.	Raça	55

3.2. Influência da época do ano, género e raça no diagnóstico de <i>B. canis</i> , <i>E. canis</i> , <i>R. conorii</i> e <i>L. infantum</i>	58
4. Discussão	59
4.1. Babesiose Canina por <i>Babesia canis</i>	59
4.2. Ehrlichiose Canina por <i>Ehrlichia canis</i>	60
4.3. Rickettsiose Canina por <i>Rickettsia conorii</i>	61
4.4. Leishmaniose Canina por <i>Leishmania infantum</i>	63
5. Conclusão	66
6. Bibliografia	67

Índice de tabelas

Tabela 1 - Taxonomia <i>B. canis</i>	11
Tabela 2 – Babesiose Canina – Prevalência	17
Tabela 3 - Taxonomia <i>E. canis</i>	19
Tabela 4 – Prevalência de Ehrlichiose Canina - distribuição mundial	22
Tabela 5 – Prevalência de Ehrlichiose Canina em Portugal	22
Tabela 6 - Taxonomia <i>R. conorii</i>	24
Tabela 7 - <i>Rickettsia conorii</i> – estudos de prevalência na Europa.....	27
Tabela 8 - Estudos de prevalência de <i>R. conorii</i> em Portugal	28
Tabela 9 - Taxonomia Leishmaniose Canina	30
Tabela 10 - Leishmaniose Canina – distribuição mundial	32
Tabela 11 – Prevalência da LC a nível Nacional.....	33
Tabela 12 – Estudos de prevalência de LC em Portugal.....	34
Tabela 13 – Espécies de flebótomos existentes em Portugal.....	35
Tabela 14 – Vectores e zimodemos associados em Portugal	35
Tabela 15 - Epidemiologia dos flebótomos em Portugal.....	36
Tabela 16 - Temperaturas de desenvolvimento larvar	37
Tabela 17 - Sinais clínicos e alterações laboratoriais mais comuns na LC	41
Tabela 18 - Sensibilidade e especificidade dos vários métodos de diagnóstico.....	43
Tabela 19 - Ixodídeos existentes em Portugal	45
Tabela 20 - Doenças transmitidas por vectores	48
Tabela 21 - Proporção dos animais suspeitos positivos a <i>B. canis</i> , <i>E. canis</i> , <i>R. conorii</i> e <i>L. infantum</i>	52
Tabela 22 - Média de Idades dos canídeos da amostra em estudo	52
Tabela 23 - Relação entre o número de positivos a <i>B. canis</i> , <i>E. canis</i> , <i>R. conorii</i> e <i>L. infantum</i> e época do ano.....	53
Tabela 24 - Casos mensais de <i>L. infantum</i>	54
Tabela 25 - Casos mensais de <i>R. conorii</i>	54
Tabela 26 - Relação entre <i>B. canis</i> , <i>E. canis</i> , <i>R. conorii</i> e <i>L. infantum</i> e o género.....	55
Tabela 27 - Relação entre <i>B. canis</i> , <i>E. canis</i> , <i>R. conorii</i> e <i>L. infantum</i> e a raça	56
Tabela 28 - Valores de <i>p</i> calculado através do teste Exacto de Fisher.....	58

Índice de Figuras

Figura 1 – <i>Babesia canis</i>	12
Figura 2 – Ciclo de vida da <i>Babesia</i> spp.	12
Figura 3 - Distribuição da Babesiose Canina na Europa	14
Figura 4 - <i>Ehrlichia canis</i> no interior de um monócito.....	19
Figura 5 - Distribuição da Ehrlichiose Canina na Europa:	21
Figura 6 - Mapa da prevalência da LC em Portugal	33
Figura 7 - <i>Phlebotomus perniciosus</i>	34
Figura 8 - Ciclo de vida <i>L. infantum</i>	38
Figura 9 - Citologia <i>L. infantum</i>	41
Figura 10 - Fêmea de <i>R. sanguineus</i>	45
Figura 11 – Fêmea de <i>I. ricinus</i>	46
Figura 12 – Fêmea de <i>D. reticulatus</i>	46
Figura 13 - Diagrama de Venn com quatro variáveis relacionando o número de infectados e as co-infecções	51
Figura 14 - Raças mais representativas no diagnóstico de <i>Babesia canis</i>	57
Figura 15 - Raças mais representativas no diagnóstico de <i>Ehrlichia canis</i>	57
Figura 16 - Raças mais representativas no diagnóstico de <i>Rickettsia conorii</i>	57
Figura 17 - Raças mais representativas no diagnóstico de <i>Leishmania infantum</i>	58

Introdução

As doenças transmitidas por vectores ocorrem pela picada, nomeadamente de mosquitos, flebótomos e ixodídeos e podem ser causadas por parasitas, bactérias ou vírus. Para além de algumas apresentarem prevalências elevadas e/ou serem endémicas, têm importância acrescida por muitas serem zoonoses (Beugnet & Marié, 2009; Otranto & Dantas-Torres, 2010).

Nos últimos anos, tem havido uma emergência ou reemergência de algumas doenças e muitas associadas a alterações epidemiológicas, sobretudo na sua expansão geográfica, atingindo zonas anteriormente consideradas livres de doença (Shaw *et al.*, 2001). Vários factores afectaram este fenómeno, especialmente o aumento da temperatura, que leva à alteração do microclima, biologia e comportamentos alimentares dos vectores (Kramer, 2008), bem como as viagens de animais para zonas endémicas e a importação de animais provenientes destas zonas (Kramer, 2008; Beugnet & Marié, 2009).

Na presente dissertação serão abordadas as doenças diagnosticadas durante o período de estágio que foram a Babesiose, a Ehrlichiose, a Rickettsiose e a Leishmaniose.

1.1. Babesiose Canina

1.1.1. Taxonomia

A Babesiose, descrita pela primeira vez por Victor Babes no final do século XIX, foi a primeira doença transmitida por ixodídeos a ser descrita nos animais domésticos e sete anos mais tarde foi descrita pela primeira vez, em Itália, a *B. canis* em cães (Kramer, 2009).

A *Babesia canis* (Tabela 1) é a espécie mais importante deste estudo, uma vez foi o agente diagnosticado durante o período de estágio e tem como hospedeiro o cão, não revelando importância zoonótica, contudo existem algumas espécies com esta característica (Taboada & Lobetti, 2006).

Tabela 1 - Taxonomia *B. canis*

Filo	<i>Apicomplexa</i>
Ordem	<i>Piroplasmida</i>
Família	<i>Babesiidae</i>
Género	<i>Babesia</i> spp
Espécie	<i>Babesia canis</i>

Legenda – Nesta tabela é possível observar-se a taxonomia referente à *B. canis* (Irwin, 2005)

1.1.2. Etiologia

A identificação da *Babesia* spp é realizada segundo a morfologia intraeritrocitária a partir de esfregaços de sangue periférico (Kramer, 2009). Assim, de acordo com esta identificação diferenciam-se dois tipos de *Babesia*, a grande, cujos parasitas medem cerca de 2 x 5 µm e encontram-se geralmente aos pares (Shaw & Day, 2005; Taboada & Lobetti, 2006), da qual faz parte a *B. canis* (Figura 1). Com base na imunidade cruzada, serologia, especificidade do vector e filogenia molecular, originou três subespécies, a *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi* (Carret *et al.*, 1999; Taboada & Lobetti, 2006).

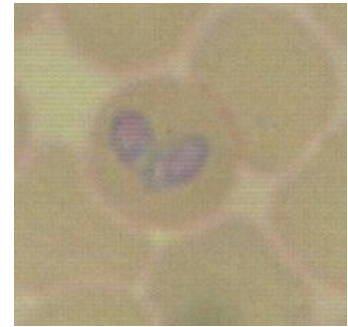


Figura 1 – *Babesia canis*. Adaptada de CVBD (2009)

A *Babesia* pequena, *B. gibsoni*, mede cerca de 0,8 a 1,2 x 3,2 µm (Shaw & Day, 2005) e encontram-se geralmente solitárias nos eritrócitos. Mais recentemente, foram incluídas duas novas espécies deste tipo, a *B. conradae* e a *B. microti-like*, também denominada *Theileria annae* (Camacho *et al.*, 2001; Taboada & Lobetti, 2006).

1.1.3. Transmissão e ciclo de vida da *Babesia* spp

A transmissão ocorre pela picada da carraça, sendo necessários 2 ou 3 dias de parasitismo para inocular o agente, que invade os eritrócitos. Uma vez no seu interior multiplicam-se por fissão binária, geralmente em duas células-filhas, os merozoítos, provocando a lise da célula, havendo disseminação para outros eritrócitos (Figura 2) (Taboada & Lobetti, 2006). O período de incubação varia de 4 a 21 dias (Boozer & Macintire, 2003).

No vector, a transmissão pode ser transestadial ou transovárica (Taboada & Lobetti, 2006).

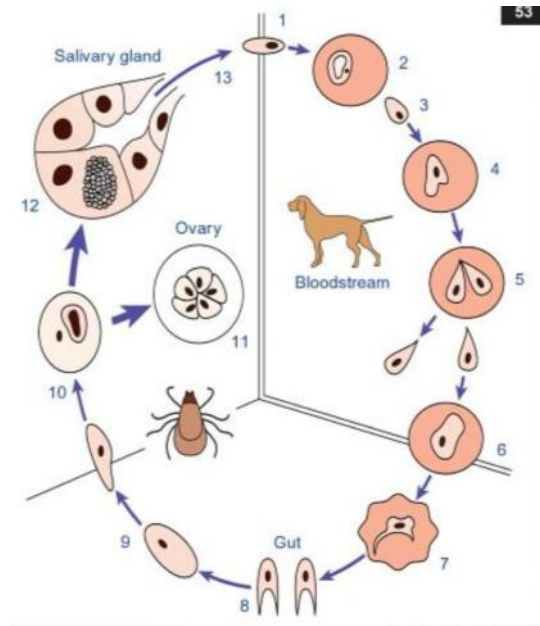


Figura 2 – Ciclo de vida da *Babesia* spp. Legenda: 1 – Esporozoíto na corrente sanguínea do cão; 2 – Trofozoíto em forma de anel; 3 – Merozoíto; 4 – Fissão binária; 5 – Trofozoítos em par; 6 – Eritrócitos infectados; 7 – Lise do eritrócito no intestino da carraça; 8 – Desenvolvimento do gamonte e fusão; 9 – Formação do oocineto; 10 – Migração do oocineto do intestino para outros tecidos na carraça; 11 – Desenvolvimento dos esporokinetes nos ovários; 12 – Desenvolvimento dos esporokinetes para uma forma larga que contém esporozoítos; 13 – Liberação de esporozoítos na saliva da carraça durante a sua alimentação. Adaptado de Irwin, 2005

Contudo, já foi sugerida a transmissão transplacentária de *B. canis canis* (Cardoso *et al.*, 2010a).

No caso da *B. gibsoni*, há uma forte suspeita da sua transmissão ocorrer na ausência do vector, através do contacto com sangue infectado, muitas vezes associado à raça American Pit Bull Terrier e American Staffordshire, por mordeduras (Boozer, 2005; Yeagley *et al.*, 2009).

A Babesiose, pode ser transmitida por transfusão de sangue, estando aconselhado fazer o despiste aos dadores (Wardrop *et al.*, 2005).

1.1.4. Patogenia e sintomatologia

A severidade da doença depende do agente em questão, bem como de factores intrínsecos ao hospedeiro, como a idade e estado imunitário, uma vez que cachorros e cães jovens têm maior risco de contrair a doença devido à baixa resposta humoral (Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009).

Após a inoculação do agente, o hospedeiro desenvolve uma resposta imunitária, através da activação sistema de complemento, promovendo a opsonização destes eritrócitos, que são posteriormente removidos através do sistema fagocitário mononuclear. Como alternativa, se o número de eritrócitos infectados for baixo, poderá ocorrer a destruição dos mesmos através de uma resposta mediada por células, particularmente as células T citotóxicas (Tizard, 2004). No entanto, a capacidade do sistema imunitário em eliminar completamente o parasita é limitada, tornando-se muitas vezes portadores crónicos, após recuperação clínica (Taboada & Lobetti, 2006).

A sintomatologia comum a todas as espécies de *Babesia* é pirexia, anorexia, esplenomegália, anemia e trombocitopenia. A anemia hemolítica ocorre por lise dos eritrócitos ou por hemólise intra ou extra vascular (Taboada & Lobetti, 2006).

Em relação às estirpes, descritas na Europa e particularmente em Portugal, a *B. canis vogeli* é a menos patogénica, com um curso de doença subclínica, excepto em cachorros com menos de 4 meses e adultos com doenças concomitantes e factores predisponentes como esplenectomia ou imunossupressão (Solano-Gallego, 2008c). A *B. canis canis* apresenta uma severidade muito variada, desde moderada a grave e a parasitemia não se relaciona com a gravidade dos sintomas (Solano-Gallego, 2008c). No caso da *B. gibsoni*, a doença é frequentemente subclínica nos American Pit Bull Terrier. A severidade da doença é superior quando o agente é a *T. annae* do que a *B. canis* (Camacho-Garcia, 2006).

A *B. canis rossi* é o agente mais patogénico, devido às complicações decorrentes da doença, mas que não foi descrita em Portugal (Solano-Gallego, 2008c).

1.1.5. Distribuição Babesiose Canina

A existência da doença depende da distribuição dos vectores (Figura 3), deste modo, Irwin (2009) considerou uma área endémica, onde o agente está bem estabelecido e uma área onde foram descritas infecções autóctones esporádicas ou casos associados a viagens. Assim, em zonas anteriormente livres, como no Norte da Europa, têm sido descritos vários casos (Matijila *et al.*, 2005; Kramer, 2009; Oines *et al.*, 2010; Kirtz *et al.*, 2012).

Os seus vectores, o *R. sanguineus* é mais comum em regiões quentes da Europa (Taboada & Lobetti, 2006), Austrália e América Latina, já o *Dermacentor* spp, subespécie *D. reticulatus*, é mais comum na Europa Ocidental e Central (Taboada & Lobetti, 2006).



Figura 3 - Distribuição da Babesiose Canina na Europa. Verde – Sem ocorrência; Vermelho – Ocorrência. Adaptado de <http://www.cvbd.org/en/occurrence-maps/europe/>

A *B. canis* apresenta uma distribuição Mundial, sendo encontrada em todos os Continentes (Taboada & Lobetti, 2006).

A subespécie *B. canis canis* é a mais prevalente na Europa, encontrando-se descrita na Áustria (Kirtz *et al.*, 2012), Croácia (Beck *et al.*, 2009; Brkljacić *et al.*, 2010), França (Bourdoiseau, 2006), Alemanha (Menn *et al.*, 2010; Hamel *et al.*, 2012), Hungria (Földvári *et al.*, 2005), Itália (Solano-Gallego *et al.*, 2008a), Holanda (Matijla *et al.*, 2005), Polónia (Adaszek & Winiarczyk, 2008), Portugal (Cardoso *et al.*, 2008a; Cardoso *et al.*, 2010a), Eslovénia (Duh *et al.*, 2004), Espanha (Tabar *et al.*, 2009), Suíça (Sager *et al.*, 2005) e Noruega (Oines *et al.*, 2010), bem como algumas zonas da Ásia (Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009). Em Portugal, é uma doença endémica no Norte (Cardoso *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2010a), ocorrendo também no Noroeste (Diz-Lopes *et al.*, 2005), Braga (Simões *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2008a) e Setúbal (Silva, 2011) (Tabela 2). O vector principal é o *Dermacentor* spp (Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009).

A subespécie *B. canis vogeli*, tem como vector o *R. sanguineus* e uma vez que este vector apresenta uma distribuição Mundial (Taboada & Lobetti, 2006; Kramer, 2009), esta subespécie poderá ser encontrada nos vários continentes, desde regiões tropicais e subtropicais até latitudes mais frias (Irwin, 2009), como África (Matijla *et al.*, 2004, Taboada & Lobetti, 2006), Ásia (Taboada & Lobetti, 2006), América do Norte e Sul (Taboada & Lobetti, 2006; Birkenheuer *et al.*, 2005), Europa (Taboada & Lobetti, 2006) e Austrália (Taboada & Lobetti, 2006; Jefferies *et al.*, 2003).

A subespécie *B. canis rossi* foi originalmente descrita na África do Sul (Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009), contudo a sua distribuição alastrou para a Nigéria (Sasaki *et al.*, 2007) e Sudão (Oyamada *et al.*, 2005). O seu vector é o *Haemaphysalis leachi* (Irwin, 2009).

Foi descoberta outra *Babesia*, na Carolina do Norte, ainda incompleta (Birkenheuer *et al.*, 2004; Taboada & Loetti, 2006; Sikorski *et al.*, 2010), desconhecendo-se o seu vector (Taboada & Lobetti, 2006).

A espécie *B. gibsoni* encontra-se associada sobretudo às raças American Pit Bull Terrier e American Staffordshire (Birkenheuer *et al.*, 2006; Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009). Em Portugal não existem estudos que demonstrem a sua existência. O principal vector é o *Haemaphysalis* spp, no entanto há suspeita que o *R. sanguineus* também o possa ser (Boozer, 2005; Taboada & Lobetti, 2006).

A espécie *B. microti-like* é um piroplasma semelhante ao dos roedores (Camacho *et al.*, 2001; Zahler *et al.*, 2000). É endémica no Norte de Espanha (Camacho *et al.*, 2001; Criado-Fornelio *et al.*, 2003a; Camacho-Garcia, 2006), existindo casos descritos no Mississippi (Yeagley *et al.*, 2009), Croácia (Beck *et al.*, 2009), Barcelona (Tabar *et al.*, 2009) e Nordeste Espanhol (Camacho *et al.*, 2001). Em Portugal foi detectada em gatos (Criado-Fornelio *et al.*, 2003b) e cães (Simões *et al.*, 2011). O principal vector é o *Ixodes hexagonus* (Camacho *et al.*, 2003; Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009), tendo já sido detecada por técnicas moleculares do *I. ricinus* e *R. sanguineus*, em Itália (Cassini *et al.*, 2009;) e do *I. ricinus* em Espanha (Lledó *et al.*, 2010).

A *B. conradae* foi identificada em cães na Califórnia (Kjemtrup *et al.*, 2006; Di Cicco *et al.*, 2012), desconhecendo-se ainda o seu vector (Irwin, 2005); *B. equi* e *B. annulata*, isoladas num pequeno número de cães na Europa (Criado-Fornelio *et al.*, 2003a; Criado *et al.*, 2006).

A espécie *Theileria* spp foi isolada em cães da África do Sul, desconhecendo-se ainda o seu vector (Irwin, 2009).

Tabela 2 – Babesiose Canina – Prevalência

Região	Amostra	Agente	Prevalência %	Teste	Autor
Eslovénia	n= 238	<i>Babesia</i> spp	5,9	PCR	Duh <i>et al.</i> (2004)
		<i>B. canis canis</i>	4,6		
		<i>B. canis vogeli</i>	1,3		
Hungria	n= 651	<i>B. canis</i>	6	IFI	Hornok <i>et al.</i> (2006)
	n= 44	<i>B. canis canis</i>	88,6	PCR	Földvári <i>et al.</i> (2005)
Itália					
Sicília	n= 342	<i>B. canis</i>	5,17	SR	Torina <i>et al.</i> (2006)
	n= 164	<i>Babesia</i> spp	27,4	PCR	Solano-Gallego <i>et al.</i> (2008a)
		<i>B. canis canis</i>	20,7		
		<i>B. canis vogeli</i>	6,7		
		n= 1*	<i>B. gibsoni</i>		
		n=2	<i>B. gibsoni</i>	100	PCR
Alemanha	n= 4681	<i>B. canis</i>	24	IFI	Menn <i>et al.</i> (2010)
	n= 216	<i>B. canis canis</i>	42,8 [†]	Método Directo (56%)	Hamel <i>et al.</i> (2012)
Eslováquia	n= 87	<i>B.canis canis</i>	91,95	PCR	Majláthová <i>et al.</i> (2011)
Noruega	n=1	<i>B. canis canis</i>	100 [‡]	PCR	Oines <i>et al.</i> (2010)
Croácia	n= 848 *	<i>Babesia</i> spp	3,42	PCR	Beck <i>et al.</i> (2009)
		<i>B. canis canis</i>	69		
		<i>B. canis vogeli</i>	7		
		<i>B. gibsoni</i>	21		
		<i>T. annae</i>	3		
	n= 81 [□]	<i>Babesia</i> spp	100	PCR	Brkijljacic <i>et al.</i> (2010)
		<i>B. canis canis</i>	96		
		<i>B. canis vogeli</i>	1,2		
	n= 28	<i>B.canis canis</i>	96,4	PCR	
Portugal					
Norte	n= 8	<i>B. canis canis</i> (n=7) <i>B. canis vogeli</i> (n=1)	100	PCR	Cardoso <i>et al.</i> (2008a)
Norte	n= 45	<i>B. canis canis</i> <i>B. canis vogeli</i>	98 2,22	PCR; Citologia	Cardoso <i>et al.</i> (2010a)
Portugal	n= 331	<i>B. canis</i>	58	IFI	Menn <i>et al.</i> (2010)
Braga	n= 3	<i>B. microti</i> -like	100	PCR	Simões <i>et al.</i> (2011)
Setúbal	n = 80	<i>B. canis</i>	20	IFI	Silva (2011)

Legenda - Na tabela pode observar-se a distribuição de *Babesia* spp no mundo. *1º caso *B. gibsoni* Itália; [†] Cães importados da Romênia e Hungria; [‡] 1º caso *B. canis canis* na Noruega; * Animais assintomáticos; [□] Animais sintomáticos; SR – Sem referência

1.1.6. Factores de risco

A literatura refere que na Europa Central a sazonalidade da doença existe, no entanto a presença do *Dermacentor* spp está fortemente dependente do clima local (Leschnik *et al.*, 2008). Já em Portugal, Cardoso *et al.* (2010a) obtiveram um maior número de casos nos meses mais frios, no Outono e Inverno. Enquanto na Zâmbia, Nalubamba *et al.* (2011) obtiveram dois picos da doença, um na época da chuva, entre Novembro e Março e outro na época seca, Junho e Julho.

O ambiente em que os canídeos vivem contribuiu para o desenvolvimento e manutenção da doença. Assim, ambientes rurais propiciam o contacto com o vector, uma vez que estão mais expostos a este e por muitos deles serem caçadores. Contudo, também a prevenção realizada nestes meios poderá ser diferente do urbano (Cardoso *et al.*, 2010a)

Quanto ao género, Mellanby *et al.* (2011) constataram que machos inteiros e castrados e fêmeas inteiras têm maior risco de infecção, já Cardoso *et al.* (2010a), não verificaram esta relação.

Em relação à raça, alguns estudos revelam que a percentagem de infecção é superior nos canídeos de raça, como Podengo e Epagneul Breton (Cardoso *et al.*, 2010a) e Labradores Retrievers em comparação a raças Toy (Mellanby *et al.*, 2011).

Em relação à idade, Nalubamba *et al.* (2011) constataram que animais com menos de 1 ano e entre 2 e 5 anos têm maior probabilidade de serem positivos.

1.1.7. Diagnóstico

A serologia, pela técnica de imunofluorescência indirecta (IFI), é o método mais utilizado no diagnóstico da Babesiose, já que apresenta elevada sensibilidade. Contudo, a sua principal limitação é o facto de não diferenciar infecções agudas de crónicas, bem como a possibilidade de ocorrência de reacções cruzadas entre as espécies de *Babesia*, nomeadamente a *B. gibsoni* (Alleman, 2005; Taboada & Lobetti, 2006). No entanto, não existem reacções cruzadas entre *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys* e *Babesia* spp (Irwin, 2007).

Outro método serológico utilizado com alguma frequência é a técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA acrónimo anglo-saxónico “Enzyme-linked immunosorbent assay”), que é igualmente sensível mas menos específico que o IFI (Taboada & Lobetti, 2006), podendo também ocorrer reacções cruzadas com outras espécies de *Babesia* (Aboge, 2007).

Os métodos moleculares, particularmente a reacção em cadeia da polimerase (PCR), apresentam elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico deste agente (Irwin, 2009), permitindo a diferenciação das várias subespécies de *B. canis*, bem como entre *B. gibsoni* e *B. canis* (Taboada & Lobetti, 2006), sendo útil em casos de baixa parasitemia (Cardoso *et al.*, 2010a). Contudo, nos animais assintomáticos ou crónicos, podem resultar em falsos negativos, sendo necessário realizar novamente o teste para confirmar ou não a infecção (Jefferies *et al.*, 2007).

1.2. Ehrlichiose Canina

1.2.1. Taxonomia

Recentemente, a ordem *Rickettsiales* foi reclassificada originando duas grandes famílias, a *Anaplasmataceae*, que, com base na análise filogenética dos genes 16 rRNA e *groEL*, se subdividiu em quatro géneros: *Ehrlichia* spp, *Anaplasma* spp, *Wolbachia* spp e *Neorickettsia* spp, e a família *Rickettsiaceae*, que engloba a *Rickettsia* spp e *Orientia* spp (Harrus *et al.*, 2005; Irwin, 2007). Para este estudo as espécies com mais interesse foram a *E. canis* (Tabela 3) e *R. conorii*.

O género *Ehrlichia* spp, inclui a *E. canis*, com distribuição Mundial, a *E. chaffeensis*, apenas isolado nos Estados Unidos e a *E. ewingii* isolada nos Estados Unidos e África (Irwin, 2007). No género *Anaplasma* spp, está incluída a espécie *A. phagocytophilum*, responsável pela Ehrlichiose granulocítica canina e felina, e a espécie *A. platys*, responsável pela Trombocitopenia infecciosa cíclica canina (Harrus *et al.*, 2005). A *E. canis* foi identificada, pela primeira vez, em 1935 por Donatien e Lestoquard, na Argélia.

Tabela 3 - Taxonomia *E. canis*

Ordem	<i>Rickettsiales</i>
Família	<i>Anaplasmataceae</i>
Género	<i>Ehrlichia</i>
Espécie	<i>Ehrlichia canis</i>

Legenda – Esta tabela refere-se à espécie *E. canis*. Adaptada de Harrus *et al.*, 2005

1.2.2. *Ehrlichia canis* – Ehrlichiose Monocítica Canina

1.2.3.1. Etiologia

A *E. canis* (Figura 4) é uma bactéria intracelular obrigatória, gram-negativa, com cerca de 1 µm de diâmetro

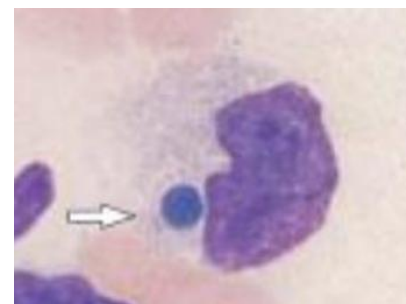


Figura 4 - *Ehrlichia canis* no interior de um monócito. Adaptado de Shaw & Day, 2005)

(Harrus *et al.*, 2005), com tropismo para os monócitos e macrófagos do hospedeiro definitivo. O cão é o principal hospedeiro definitivo, embora outros membros da família *Canidae* e os gatos, domésticos e selvagens, também possam ser infectados (Harrus *et al.*, 2005).

1.2.3.2. Transmissão e ciclo de vida

O principal vector de *E. canis* é o *R. sanguineus*, embora em infecções experimentais o *D. variabilis* também possa transmiti-lo (Harrus, 2006; Irwin, 2007).

A transmissão de *E. canis* ocorre através picada da carraça, que inocula este agente no hospedeiro definitivo, sendo transportado pelo sangue e linfa, infectando macrófagos, especialmente os do baço e fígado. Nestas células, a *E. canis* replica por fissão binária, sendo posteriormente disseminados para os restantes órgãos (Harrus *et al.*, 2005; Harrus, 2006). Experimentalmente sabe-se que o baço desempenha um importante papel no armazenamento deste agente, sobretudo em fases subclínicas (Harrus, 2006).

Encontra-se também descrita a transmissão por transfusão de sangue, sendo necessário realizar o seu despiste nos dadores (Wardrop *et al.*, 2005).

1.2.3.3. Patogenia e sintomatologia

O período de incubação pode ir de 8 a 20 dias (Harrus *et al.*, 2005; Harrus, 2006) e a evolução da doença pode ser aguda, subclínica ou crónica. Na fase aguda, que pode durar entre 1 a 4 semanas, a maioria dos cães recuperam se tratados adequadamente; na fase subclínica, encontram-se normalmente os cães que não foram tratados adequadamente, tornando-se portadores assintomáticos, durante meses ou anos. Estes animais podem recuperar espontaneamente ou evoluírem para a fase crónica, que é a mais severa e de pior prognóstico. Esta fase apresenta grande mortalidade, ocorrendo normalmente por hemorragias ou infecções secundárias (Harrus *et al.*, 2005).

A sintomatologia relaciona-se com a fase em que a doença se encontra. Na fase aguda os sinais clínicos são muitas vezes inespecíficos: depressão, letargia, anorexia, pirexia, taquipneia e perda de peso e outros mais específicos como linfadenomegália, esplenomegália, petéquias e equimoses, variando de suaves a severos. Na fase crónica, os sinais clínicos são semelhantes, embora mais severos, sendo possível o desenvolvimento de infecções secundárias (Harrus *et al.*, 2005). Tanto na fase aguda como na crónica podem ocorrer problemas neurológicos e oculares. Contudo, a trombocitopenia é a alteração hematológica

mais consistente nesta infecção, que ocorre devido à ligação dos anticorpos às plaquetas, pelo aumento do consumo destas células, pelo sequestro esplénico e diminuição do tempo de semi-vida das plaquetas na fase aguda e a sua diminuição na fase crónica (Harrus *et al.*, 2005).

1.2.3.4. Distribuição mundial



Tabela 4 – Prevalência de Ehrlichiose Canina - distribuição mundial

Região	Amostra	Proporção %	Teste	Autor
Itália				
Norte		2,9		
Centro	n= 601	8	PCR-TR	Solano-Gallego <i>et al.</i> (2006b)
Sul		9,7		
Sicília	n= 342	21,7	SR	Torina & Caracappa (2006)
Espanha				
Ourense	n= 479	3,13		
Pontevedra			IFI	Amusategui <i>et al.</i> (2008)
Ourense ¹	n= 170	54,7		
Alemanha	n= 4681 *	10,5	IFI	Menn <i>et al.</i> (2010)
Brasil				
Nordeste	n= 472	34,5	PCR	Souza <i>et al.</i> (2010)
América do Norte	n= 8662	0,8	ELISA	Beall <i>et al.</i> (2012)
Costa Rica	n= 310	47,7	nPCR	Romero <i>et al.</i> (2011)

Legenda - Nesta tabela pode observar-se a distribuição da Ehrlichiose canina no Mundo. * Cães importados ou que viajaram para zonas endêmicas. SR – Sem referência; n PCR – nested PCR

1.2.3.5. Epidemiologia em Portugal

Em Portugal, vários estudos realizados comprovam a existência deste agente no País (Tabela 5).

Tabela 5 – Prevalência de Ehrlichiose Canina em Portugal

Região	Amostra	Prevalência %	Teste	Autor	
Setúbal	n= 104	50	IFI	Bacellar <i>et al.</i> (1995)	
Algarve	n= 55	22	PCR	Alexandre <i>et al.</i> (2009)	
Norte	n= 4	25	PCR	Cardoso <i>et al.</i> (2010b)	
Portugal	n= 331	24,8	IFI	Menn <i>et al.</i> (2010)	
		4,1 ‡			
Norte		0,7			
Centro		0,9			
Alentejo	n= 557 *	2,4	ELISA	Cardoso <i>et al.</i> (2012)	
Lisboa		6,3			
Algarve		13,9			
Açores		0			
Madeira		0			
		16,4 ‡			
Norte		7,6			
Centro		9			
Alentejo	n= 628 †	25,4	ELISA		
Lisboa		19,4			
Algarve		23,8			
Acores		0			

Legenda - Nesta tabela pode observar-se a distribuição da Ehrlichiose canina em Portugal. * Animais assintomáticos; † Animais sintomáticos; ‡ Prevalência da amostra total

1.2.3.6. Factores de risco

A literatura refere que o ambiente em que os cães vivem é um factor muito importante nas doenças transmitidas por artrópodes, uma vez que a sua ocorrência depende da presença de vectores. Assim, contrariamente aos pertencentes a ambientes rurais, os cães de zonas urbanas apresentam menor probabilidade de desenvolver esta doença, uma vez que este não é o ambiente ideal para o vector e a profilaxia realizada por parte dos proprietários poderá ser mais frequente (Trapp *et al.*, 2006; Carlos *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2012). Também o facto de permanecerem mais tempo no exterior é um factor de risco, uma vez que estão mais expostos ao vector (Cardoso *et al.*, 2012).

Em relação à raça, o Pastor Alemão parece apresentar maior susceptibilidade à infecção, sendo também mais severa e com elevada taxa de mortalidade (Harrus *et al.*, 2005).

Relativamente à idade há alguma controvérsia entre os autores, uma vez que uns afirmam não haver relação entre o diagnóstico deste agente e a idade (Shaw & Day, 2005) e outros descrevem que cães com idade superior a 1 ano têm maior risco de infecção (Cardoso *et al.*, 2012), quanto ao género a literatura refere não haver qualquer relação com o diagnóstico deste agente (Shaw & Day, 2005).

1.2.3.7. Diagnóstico

A serologia, pela técnica de IFI, é o método de eleição para o diagnóstico de *E. canis* (Shaw & Day, 2005). Contudo, é fundamental conhecer as suas limitações, de modo a serem contornadas, como o curso da doença, as reacções cruzadas com outras espécies de *Ehrlichia* spp e *A. phagocytophilum* e a persistência de anticorpos após tratamento que podem perdurar durante meses a anos (Waner *et al.*, 2001, Harrus *et al.*, 2005). No entanto, não há possibilidade de reacções cruzadas entre *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia* spp (Irwin, 2007).

O diagnóstico molecular, em particular o PCR, é um método sensível para diagnóstico na fase aguda (Harrus, 2006; Stich *et al.*, 2008; Mylonakis *et al.*, 2009; Alexandre *et al.*, 2009), cerca de 4 a 10 dias após infecção e ainda numa fase sem seroconversão. O PCR realizado a partir de amostras de sangue revelou não ser muito sensível, contrariamente às provenientes do baço, especialmente para monitorização após tratamento. Assim, esta técnica deverá ser utilizada em conjunto com a serologia, de modo a ser obtido um resultado mais fidedigno (Harrus, 2006).

1.3. Rickettsiose Canina

1.3.1. Taxonomia

Será apenas referida a espécie *R. conorii*, uma vez que foi o agente diagnosticado durante o estágio (Tabela 6).

Pertence ao Grupo da Febre Maculosa (Spotted Fever Group), com distribuição desde a Bacia Mediterrânea ao Litoral do Mar Cáspio, Médio Oriente, Índia e África. Neste grupo está também incluída a Rocky Mountain Spotted Fever, cujo agente é a *R. rickettsii* e ocorre na América do Norte e Sul e a Japanese Spotted Fever, cujo agente é *R. japonica* e ocorre no Japão. Estes grupos estão associados à transmissão por carrças (Greene & Breitschwerdt, 2006).

Tabela 6 - Taxonomia *R. conorii*

Ordem	<i>Rickettsiales</i>
Família	<i>Rickettsiaceae</i>
Género	<i>Rickettsia</i>
Espécie	<i>Rickettsia conorii</i>

Adaptado de Raoul & Roux (1997)

1.3.2. Etiologia

O agente etiológico responsável pela Rickettsiose canina, na Bacia Mediterrânica, é a *R. conorii*. É uma bactéria, intracelular obrigatória, gram-negativa de forma coco-bacilar (Rovero *et al.*, 2008).

A *R. conorii* é um organismo idêntico à *R. rickettsii* (Greene & Breitschwerdt, 2006) sendo utilizado como modelo para caracterizar o ciclo de vida, uma vez, que ainda não está totalmente esclarecido, nem mesmo a relação entre o vector e o agente (Parola *et al.*, 2009).

1.3.3. Transmissão e ciclo de vida da *Rickettsia* spp

As carrças podem ser infectadas por transmissão horizontal, transtadial ou transovárica. O ciclo silvático é mantido, geralmente por pequenos roedores e formas imaturas das carrças. Também é possível a transmissão venérea durante a cópula das carrças adultas (Greene & Breitschwerdt, 2006).

Após a picada da carrça infectada, ocorre a disseminação da *Rickettsia rickettsia* através da circulação sanguínea, invadindo e replicando no endotélio de pequenas artérias e vénulas. O dano provocado nestes vasos resulta em vasculites, com activação plaquetária e sistema de coagulação. Há vasculite necrótica

progressiva, ocorrendo a activação do sistema de complemento, culminando em necrose vascular e extravasamento sanguíneo. Os órgãos mais afectados são a pele, cérebro, coração e rins. Como referido anteriormente, utiliza-se este agente como modelo para caracterizar o ciclo de vida da *R. conorii* (Greene & Breitschwerdt, 2006).

1.3.4. Patogenia e sintomatologia

A sintomatologia provocada pela *R. conorii* no cão ainda não está totalmente esclarecida (Kelly *et al.*, 1992; Segura-Porta *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2006a), tendo sido referidos na literatura, apenas 2 casos em canídeos desde o primeiro caso descrito no Homem, em 1932 (Kelly *et al.*, 1992). Mas, mais recentemente, foram descritos outros três casos em Yorkshire Terriers, com febre de aparecimento agudo, anorexia, letargia, vômito intermitente, trombocitopenia, anemia, aumento ligeiro das enzimas hepáticas e hipoalbuminemia, confirmando a infecção por *R. conorii* (Solano-Gallego *et al.*, 2006a).

No entanto, sabe-se que em infecções experimentais em cães, os sintomas apresentados são dor, eritema e edema no local da inoculação e linfadenomegália local (Kelly *et al.*, 1992).

A sintomatologia apresentada é bastante semelhante à manifestada pelo homem e canídeos com outras espécies de *Rickettsia* (Parola *et al.*, 2005).

1.3.5. O vector e os hospedeiros

Actualmente considera-se o *Rhipicephalus sanguineus*, como o principal vector e reservatório de *R. conorii* (Raoult & Roux, 1997; Levin *et al.*, 2012).

Os principais hospedeiros são os canídeos e os roedores (Pfeffer *et al.*, 2008, Greene & Breitschwerdt, 2006), embora a sua eficácia como reservatórios não se encontre totalmente esclarecida devido à parasitemia transiente e infecção subclínica (Greene & Breitschwerdt, 2006), apesar de já ter sido descrita infecção clínica no cão (Solano-Gallego *et al.*, 2006a). Mas Levin *et al.* (2012) comprovaram que o cão tem capacidade transmitir *R. conorii* e de ser infectado através do *R. sanguineus*.

O cão, dada a sua proximidade ao homem, facilita a transmissão de carraças ao mesmo. Em algumas zonas da Europa, a percentagem de cães seropositivos relaciona-se com a incidência da infecção no homem (Herrero-Herrero *et al.*, 1989).

1.3.6. Distribuição mundial

Olmer, no Sul de França e Blanc & Caminopetros, na Grécia demonstraram que a distribuição da *R. conorii* é limitada, existindo pequenos focos da doença dentro das áreas endêmicas, apresentando uma baixa propensão para se difundir (Blanc & Caminopetros, 1932; Rovero *et al.*, 2008).

As estirpes que se encontram na zona do Mediterrâneo são a *R. conorii conorii*, isolado de Malish, que se encontra sobretudo no Sul da Europa e a estirpe de *R. conorii israelensis*, que já foi isolada em Israel, Portugal e Sicília (Rovero *et al.*, 2008).

A Rickettsiose canina é endêmica na Bacia Mediterrânea, bem como Sul da Europa e Norte de África. Mais recentemente, foram descritos casos na Argélia, Malta, Chipre, Eslovénia, Quênia, Somália, África do Sul e zonas em redor do Mar Preto, como Turquia, Bulgária e Ucrânia (Rovero *et al.*, 2008).

Já foram realizados vários estudos em diversos países da Europa, de modo a determinar a prevalência de *R. conorii* (Tabela 7).

Tabela 7 - *Rickettsia conorii* – estudos de prevalência na Europa

Região	Amostra	Proporção %	Teste	Autor
Espanha				
Províncias Centro	n= 58	58,6	IFI	Herrero <i>et al.</i> (1992)
Noroeste		23,4		
Salamanca		93,3		
Burgos				
Léon	n= 308		IFI	Delgado <i>et al.</i> (1995)
Palencia		< 30		
Soria				
Valladolid				
Zamora				
Léon	n= 84	14,28	IFI	Rojo (1997)
Vallés Occidental - Barcelona	n= 103	36,8	IFI	Espejo-Arenas <i>et al.</i> (1990)
Vallés Occidental - Barcelona	n= 138	26,1	IFI	Seguro-Porta <i>et al.</i> (1998)
Noroeste Espanha	n=649			
Ourense	n= 479	24,6	IFI	Amusategui <i>et al.</i> (2008)
Pontevedra				
Ourense	n= 170	50		
Itália				
Piemonte	n= 116	15,5	IFI	Manelli <i>et al.</i> (2003)
Sicília	n= 342	73,6	SR	Torina <i>et al.</i> (2006)
Alemanha	n= 58	34,5	IFI	Menn <i>et al.</i> (2010) *
Sul de França	n= 481	80 - 1:32 45 - 1:128	IFI	Raoul <i>et al.</i> (1985)

Legenda: Nesta tabela é possível observar-se a distribuição da *R. conorii* na Europa. * Cães importados/viajaram para zonas endémicas. SR- Sem referência

1.3.7. Epidemiologia em Portugal

As duas principais estirpes existentes em Portugal são a *R. conorii* Malish, isolada de amostras de sangue humano e do vector, *R. sanguineus*; e a *R. conorii israelensis*, apenas isolada do Homem (Bacellar *et al.*, 1999; de Sousa *et al.*, 2005).

Esta doença é endémica em Portugal (Sousa *et al.*, 2003) tal como evidenciam alguns estudos em cães e no Homem, que revelaram elevadas prevalências (Tabela 8).

Tabela 8 - Estudos de prevalência de *R. conorii* em Portugal

Região	Amostra	Agente	Proporção %	Teste	Autor
Setúbal	n = 104	<i>R. conorii</i>	85,6	IFI	Bacellar <i>et al.</i> (1995)
		<i>R. typhi</i>	26,9		
Bragança	n= 473	<i>R. conorii</i>	55,1	IFI	Figueiredo (2007)
Portugal	n= 331	<i>R. conorii</i>	62,8	IFI	Menn <i>et al.</i> (2010) [◊]
Algarve	n = 51 *	<i>R. conorii</i>	68	IFI	Alexandre <i>et al.</i> (2011) ‡
	n= 400 †	<i>R. conorii</i>	38,5		

Legenda: *Animais sintomáticos; † Animais saudáveis; ‡ PCR revelou 5 infectados por *R. conorii* Malish e 2 com *R. conorii israeli*. A maior proporção de seropositivos foi obtida entre Outubro e Dezembro (45%); ◊ Amostras provenientes de canídeos de canil de Portugal

1.3.8. Factores de risco

A bibliografia refere que a infecção por *R. conorii* e *R. rickettsii* nos Springer Spaniel Inglês com suspeita de uma deficiência de fosfofrutokinase e nas pessoas com deficiência na glucose-6-desidrogenase podem desenvolver a doença com maior severidade (Parola *et al.*, 2005; Greene & Breitschwerdt, 2006). Também cães de raça aparentam desenvolver a doença com maior severidade que os de raça indeterminada (Greene & Breitschwerdt, 2006).

Quanto ao género, Greene & Breitschwerdt (2006), refere que os machos aparentam ter maior risco de infecção, é mais severa e são mais sero-reactivos (Solano-Gallego *et al.*, 2006a), contrariamente a Delgado *et al.* (1995) e Solano-Gallego *et al.* (2008b) que não encontraram qualquer relação entre o diagnóstico deste agente e o género.

Relativamente à idade, Delgado *et al.* (1995) não a consideram factor de risco.

A época do ano é considerada um factor de risco por vários autores, sendo obtidas prevalências superiores nos meses de Primavera e Verão (Delgado *et al.*, 1995; Rojo, 1997; Parola *et al.*, 2005) enquanto Alexandre *et al.* 2011, obtiveram maior número de casos nos meses mais frios. Já Solano-Gallego *et al.* (2008b) não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre a época do ano e o diagnóstico deste agente.

O ambiente rural e semi-rural, bem como a elevada densidade populacional dos cães contribuem para a ocorrência da doença (Manneli *et al.*, 2003). Também

Amusategui *et al.* (2008) justificaram a maior prevalência nos cães de canil por estarem mais expostos ao vector, quando comparado com os que têm proprietário.

Delgado *et al.* (1995) e Rojo (1997) demonstraram que cães pastores apresentam maior probabilidade de adquirir a infecção, quando comparado aos de caça e guarda.

1.3.9. Diagnóstico

O diagnóstico de *R. conorii* pode ser realizado por IFI, especialmente o Micro-IFI, que detecta imunoglobulinas específicas, sendo o mais utilizado nas clínicas e laboratórios (Green & Breitschwerdt, 2006). Em zonas consideradas endémicas, este teste deve ser substituído por um mais específico, como o Western Blotting (WB), já que detecta uma proteína antigénica específica ou PCR (Babalis *et al.*, 1993).

O método de ELISA é outra técnica de diagnóstico, no entanto há possibilidade de reacções cruzadas com outras *Rickettsia* spp (Keysary & Strenger.,1997).

O PCR permite também distinguir as diferentes espécies de *Rickettsia* spp (Leitner *et al.*, 2002), bem como detectá-las no soro antes da seroconversão (Kidd *et al.*, 2008).

1.3.10. Importância Zoonótica

Conor & Brunch descreveram a doença no homem, pela primeira vez, em 1910, na Tunísia, mas que rapidamente se alastrou para zonas em redor do Mediterrâneo (Parola *et al.* 2005).

A transmissão ao homem ocorre através da picada da carraça, sendo necessárias 6 a 20h de parasitismo para que ocorra transmissão do agente (Gilot *et al.*, 1990).

A febre escaro-nodular é endémica em Portugal e foi descrita pela primeira vez, em 1930 por Ricardo Jorge (Sousa *et al.*, 2003).

Os agentes etiológicos são a *R. conorii* Malish e *R. conorii Israeli* (Sousa *et al.*, 2003), ambos de declaração obrigatória (DGS, 2000-2006), sendo considerada a única rickettsiose com importância a nível da Saúde Pública (Sousa *et al.*, 2003). A estirpe *Israeli* foi isolada, pela primeira vez em Portugal em 1997 (Raoult & Roux, 1997; Aharonowitz *et al.*, 1999).

Entre 1989 e 2000 a taxa de incidência nacional no Homem foi de 9,8/10⁵ habitantes, sendo uma das mais elevadas na Bacia Mediterrânea. O distrito com maior taxa de incidência foi o de Bragança, seguido de Beja, Coimbra, Castelo

Branco, Guarda, Viseu, Leiria, Vila Real, Évora e Portalegre, enquanto o de Braga teve a menor taxa. As crianças, entre 1 e 4 anos foram o grupo mais afectado. No entanto há uma subnotificação de casos, já que os autores supõem que há mais 7 casos por ano que os 1000, média diagnosticada, notificados (Sousa *et al.*, 2003).

1.4. Leishmaniose Canina

1.4.1. Taxonomia

A espécie que será abordada é a *L. infantum* (Tabela 9), uma vez que é endémica na Bacia Mediterrânea e constitui um grave problema para a saúde pública e veterinária (Dujardin *et al.*, 2008).

Tabela 9 - Taxonomia Leishmaniose Canina

Reino	Animalia
Sub-Reino	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora
Sub-filo	Mastigophora /Flagellata
Classe	Zoomastigophora
Ordem	Kinetoplastida
Sub-ordem	Trypanosomatina (1 só flagelo)
Família	Trypanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i>
Espécie	<i>L. infantum</i>

Adaptado de Canine Vector Borne Diseases - www.cvbd.org

1.4.2. Etiologia

A Leishmaniose canina (LC) tem como agente etiológico a *L. infantum* na Bacia Mediterrânea, Médio Oriente, Ásia Central e China e *L. chagasi* na América do Sul (Baneth, 2006; Palatnik-de-Sousa & Day, 2011).

A *L. infantum* é um protozoário (Solano-Galego *et al.*, 2009) e os seus principais vectores, no Sul da Europa, são o *Phlebotomus perniciosus* e o *P. ariasi* (Pires, 1984; Martín-Sánchez *et al.*, 1994; Alves-Pires *et al.*, 2001).

1.4.3. Distribuição Mundial

A distribuição da LC está fortemente condicionada pelas condições ecológicas do desenvolvimento do vector (Pereira, 2002; Claborn, 2010).

A sua distribuição cobre uma vasta área, desde a Bacia do Mediterrâneo, ao Médio Oriente e América Latina (Tabela 10), sendo a prevalência superior no

Nordeste do Brasil e países da Bacia Mediterrânea (Campino, 2002a). Contudo, em países considerados livres da doença, como na Europa Central, têm sido descritos vários casos, sobretudo em animais que viajaram ou oriundos de zonas endêmicas, em especial da Bacia Mediterrânea (Pereira, 2002, Menn *et al.*, 2010) (Tabela 10).

Os vários estudos realizados, estimam que em Portugal, Espanha, Itália e França existam cerca de 2,5 milhões de cães infectados (Baneth, 2010),

Na bacia Mediterrânea, o zimodemo MON-1 de *L. infantum* é responsável pelo maior número de casos tanto da LC como da Visceral Humana (Campino *et al.*, 2006).

Ainda não está completamente esclarecida a relação entre a LC e a Leishmaniose Visceral Humana, no entanto sabe-se que os cães têm um papel importante na sua manutenção (Campino & Maia, 2010). Sabe-se que a prevalência da LC é muito superior à humana, uma vez que no cão são incluídos os casos sintomáticos, assintomáticos e subclínicos, enquanto no Homem são apenas incluídos os casos declarados. Esta diferença poderá ser justificada pela preferência alimentar do vector e a menor susceptibilidade do homem ao parasita, contudo quando se realizam testes de hipersensibilidade retardada constata-se que cerca de 14 a 30% da população de áreas endêmicas já contactaram com o parasita, aproximando-se dos valores nos canídeos (Pereira, 2002).

Tabela 10 - Leishmaniose Canina – distribuição mundial

Região	Amostra	Prevalência %	Teste	Autor
Itália				
Toscânia	n= 171	23,9	IFI	Pozio <i>et al.</i> (1981)
Apúlia	n= 444	14,4	IFI	Brandonisio <i>et al.</i> (1992)
Alpes Franceses		3 a 17		Jambou <i>et al.</i> (1986)
Espanha				
Palma de Maiorca		14		Castañeda <i>et al.</i> (1999)
Minorca		0		
Múrcia		2,4		
Granada		8,8		
Salamanca		10 - 15		
Madrid		4,7		
Palma de Maiorca	n= 100	67	PCR	Solano-Gallego <i>et al.</i> (2001)
Barcelona	n= 153	29,4	PCR	Tabar <i>et al.</i> (2009)
Grécia	n= 2620	20	IFI/ELISA	Athanasίου <i>et al.</i> (2012)
Venezuela				
Ilha Margarita	n= 3025	33		Zerpa <i>et al.</i> (2003)
Brasil				
Município Minas Gerais	n= 33937	9,7	IFI	Franca-Silva <i>et al.</i> (2003)
França				
Marselha		80	PCR	Berrahal <i>et al.</i> (1996)
China				
Sichuan	n= 214	24,8		Shang <i>et al.</i> (2011)
Wenchuan	n= 98	23,5	PCR-TR	
Jiuzhaigou	n= 145	24,1		
Heishui	n= 71	28,2		
Alemanha	n= 4681	12,2	IFI	Menn <i>et al.</i> (2010)
Europa Central	n= 291	38	ELISA	Mettler <i>et al.</i> (2005)

Legenda - Nesta tabela é possível observar-se a distribuição de LC no mundo

1.4.4. Leishmaniose Canina em Portugal

Em Portugal, as principais espécies de flebótomos, responsáveis pela transmissão de LC são o *P. perniciosus* e o *P. ariasi* (Pires, 1984; Pires *et al.*, 1991; Alves-Pires *et al.*, 2001).

Os autores Álvares e Pereira da Silva descreveram, pela primeira vez, em 1911, a existência de cães parasitados por *Leishmania* spp. na região Metropolitana de Lisboa (Pereira, 2002).

São vários os estudos de prevalência de LC realizados no país, tal como referido pelo Observatório Nacional das Leishmanioses e outros mais recentes (Figura 6), como na região de Trás-os-Montes e Alto Douro (Cardoso *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2004a; Cardoso *et al.*, 2004b; Sousa *et al.*, 2011), a sub-região da

Cova da Beira (Coelho *et al.*, 2005), concelho da Lousã (Sousa *et al.*, 1996), a região de Lisboa e Setúbal (Cortes, 2007), Évora (Semião-Santos *et al.*, 1995) e Algarve (Campino *et al.*, 1995). Mas dada a importância desta doença, têm sido realizados vários estudos mais recentes no País, como referido nas Tabelas 11 e 12.

Mapa da prevalência da leishmaniose canina em Portugal

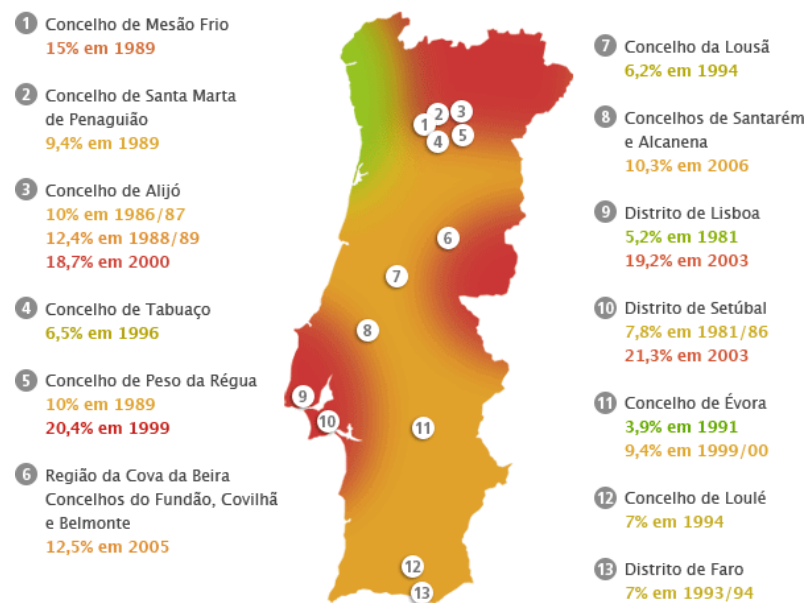


Figura 6 - Mapa da prevalência da LC em Portugal
www.onleish.org/index.php?article=24&visual=3

Tabela 11 – Prevalência da LC a nível Nacional

Região	Amostra	Seroprevalência %	Teste	Autor
Castelo Branco		16,16		
Portalegre		11,65		
Beja		11,25		
Vila Real		7,79		
Bragança		7,41		
Santarém		7,36		
Viseu		6,59		
Guarda		6,35		
Coimbra	n= 3974	5,97	TAD	Cortes <i>et al.</i> (2012)
Lisboa		5,43		
Setúbal		4,66		
Faro		4,37		
Porto		0,96		
Leiria		2,86		
Évora		2,3		
Braga		1,99		
Aveiro		1,29		
Viana do Castelo		0,88		

Legenda – Esta tabela refere-se a um estudo para determinar a prevalência de LC a nível Nacional por Cortes *et al.*, 2012

Tabela 12 – Estudos de prevalência de LC em Portugal

Região	Amostra	Prevalência %	Teste	Autor
Lisboa e Setúbal	n= 572	5,5-11,5	IFI	Abranches <i>et al.</i> (1983)
Vale de Mendiz (Alijó)		10-12,4	IFI	Abranches <i>et al.</i> (1992); Abranches <i>et al.</i> (1993); Sampaio-Silva <i>et al.</i> (1993)
Loulé (Algarve)		7		Campino <i>et al.</i> (2006)
Évora	n= 3614	3,9	TAD	Semião-Santos <i>et al.</i> (1995)
Lisboa e Setúbal		3,8		
Sul Península de Setúbal		8,8		Abranches <i>et al.</i> (1984)
Parque Natural da Arrábida		10,9		
Lisboa	n= 374	19,2	IFI	Cortes <i>et al.</i> (2007)
Alijó		18,7		
Ribalonga		0		
Castedo	n= 1540	81,1	TAD	Cardoso <i>et al.</i> (2004)
Zona do Noroeste		2,5		
Zona Intermédia		11,4		
Zona Sul		49,9		
Peso da Régua (Trás-os-Montes)	n= 294	20,4	TAD/FAST	Cardoso <i>et al.</i> (2004)
Algarve		28,8		
Serra	n= 132	3,8	IFI	Maia <i>et al.</i> (2007b)
Barrocal		13		
Litoral		1,5		

Legenda – Nesta tabela é possível observar-se os vários estudos realizados em Portugal para determinar a prevalência da LC

Apesar da elevada prevalência de LC em Portugal, o conhecimento por parte da população é ainda reduzido, uma vez que apenas 6 a 12% revelaram um nível de conhecimento satisfatório (Onleish).

Dada a importância da doença, foi criado em 2008 o Observatório Nacional de Leishmanioses, que tem como principais objectivos a implementação e manutenção de uma rede de vigilância epidemiológica e desenvolver uma estreita colaboração entre profissionais de saúde, Médicos Veterinários e investigadores (Campino & Maia, 2010).

1.4.5. Biologia e Epidemiologia do vector

O vector é o flebótomo (Figura 7), que são pequenos insectos, pertencentes à família *Psychodidae* e à sub-família *Phlebotominae*. Têm aproximadamente 2 a 3 mm (Afonso &



Figura 7 - *Phlebotomus perniciosus* Santos-Gomes *et al.* (2002)

Alves-Pires, 2002) e apenas as fêmeas são hematófagas (Killick-Kendrick *et al.*, 1999).

Em Portugal, para além dos dois principais vectores, o *P. perniciosus* e o *P. ariasi*, existem outros, como referido nas tabelas 13,14,15.

Tabela 13 – Espécies de flebotomos existentes em Portugal

Espécie	Autor
Género <i>Phlebotomus</i>	Rondani & Berté (1840)
<i>Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi</i>	Scopoli, (1786)
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti</i>	Parrot, (1917)
<i>Phlebotomus (Larroussius) perniciosus</i> *	Newstead, (1911)
<i>Phlebotomus (Larroussius) ariasi</i> *	Tonnoir, (1921)
Género <i>Sergentomyia</i>	Alves-pires <i>et al.</i> (2001)
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) minuta</i>	Rondani (1943)

Legenda - Nesta tabela é possível observar-se os vectores de *L. infantum* * existentes em Portugal (Adaptado de Afonso & Alves-Pires, 2002)

Tabela 14 – Vectores e zimodemos associados em Portugal

Região	Vector	Zimodeno	Autor
Trás-os Montes e Alto Douro	<i>P. ariasi</i>	MON-1 MON-24	Pires <i>et al.</i> (1991)
Lisboa e Setúbal	<i>P. perniciosus</i> <i>P. ariasi</i>	MON-1	Pires (1984)
Algarve	<i>P. perniciosus</i>	MON-1	Pires <i>et al.</i> (2001)

Legenda - Nesta tabela é possível observar-se os vectores e zimodemos isolados em Portugal

Tabela 15 - Epidemiologia dos flebótomos em Portugal

Região	Vector	Densidade %	Autor
Trás-os-Montes e Alto Douro	<i>P. perniciosus</i>	31,8 *	Pires (2000); Alves-Pires <i>et al.</i> (2001)
	<i>P. ariasi</i>	62,3 *	
Algarve	<i>P. perniciosus</i>	51,5 *	Pires (2000); Alves-Pires <i>et al.</i> (2001)
	<i>P. ariasi</i>	0,8 *	
Lisboa e Setúbal			
Arrábida	<i>P. perniciosus</i>	58,65 *	Afonso <i>et al.</i> (2005)
	<i>P. ariasi</i>	13,83 *	
	<i>P. sergenti</i>	0,45	
	<i>S. minuta</i>	27,07	
Algarve	<i>P. perniciosus</i>	90,51 *	Maia <i>et al.</i> (2009)
	<i>P. ariasi</i>	0,84 *	
	<i>P. sergenti</i>	2,11	
	<i>S. minuta</i>	6,33	
	<i>P. Papatasi</i>	0,21	

Legenda - Nesta tabela é possível observar-se a epidemiologia dos vectores* que transmitem *L. infantum* em Portugal.

Relativamente ao ciclo de vida do flebótomo, a metamorfose ocorre em 4 estágios até completar o seu ciclo de vida, ovo, larva, pupa e adulto. Ao contrário dos mosquitos, não necessitam de água para completar o seu desenvolvimento, mas de calor e ambientes mistos, encontrados principalmente junto a abrigos de animais, sobretudo roedores (Claborn, 2010).

A actividade das fêmeas é principalmente crepuscular ou nocturna, pois desidratam facilmente. São fracos voadores, realizando voos curtos, o máximo registado foi de 2300 metros em ambientes desertos, restringindo o seu desenvolvimento larvar à vizinhança (Claborn, 2010).

O seu desenvolvimento depende da existência de temperaturas amenas ou elevadas, da humidade, apesar de zonas alagadas ou de águas paradas não serem as ideais, necessitam de locais húmidos, bem como zonas com areal, jardins, lixo ou presença de matéria orgânica (Claborn, 2010; Afonso & Alves-Pires, 2002) (Tabela 16).

Mais recentemente, foi sugerido como possível vector o *R. sanguineus*, sendo necessários mais estudos para o comprovar (Dantas-Torres *et al.*, 2011).

Tabela 16 - Temperaturas de desenvolvimento larvar

Larvas						
Vector	Temp. Mínima	Temp. Óptima	Temp. Máxima	Altitude preferencial %	Agente causal	Autor
<i>P. perniciosus</i>	0°C	25°C		<900 m	<i>L. infantum</i>	Killick-Kendrick (1999) Pires <i>et al.</i> (1991)
<i>P. ariasi</i>	5°C		30°C *	300-500 m	<i>L. infantum</i>	Killick-Kendrick (1999); Pires <i>et al.</i> (1991)

Legenda - Esta tabela refere-se às temperaturas, humidade relativa e altitudes preferenciais das larvas e adultos de *L. infantum*. HR: Humidade relativa; *Rioux *et al.* 1985. Adaptado Afonso & Alves-Pires, 2002

Na região Mediterrânea e particularmente em Portugal, os meses de maior actividade flebotomínica são entre Maio e Outubro (Tomás & Romão, 2002), com pico em Julho e Agosto (Onleish), sendo condicionado pela temperatura amena ou elevada.

O biótopo das várias espécies é diversificado, sendo tanto endófilos como exófilos (Pires, 2000).

1.4.6. Transmissão e patogenia

A transmissão da doença ocorre através da picada do vector, tendo já sido descritas outras vias, como a directa, por transfusão de sangue (Owens *et al.*, 2001; de Freitas *et al.*, 2006), sexual (Riera & Valladares, 1996), vertical (Mancianti & Sozzi, 1995; Boggiatto *et al.*, 2011; Naucke *et al.* 2012).

Após a picada do flebótomo os parasitas são inoculados na derme, e os macrófagos em vez de os destruírem, actuam como local de multiplicação. Posteriormente, estes são destruídos libertando as Leishmanias que, progressivamente infectam outras células. Assim, os parasitas são disseminados, especialmente para os linfonodos, baço, fígado e outros órgãos e tecidos, em especial a pele (Baneth, 2006).

Os cães infectados sofrem uma depressão no sistema imunitário, desenvolvendo uma diminuição na contagem de linfócitos CD4+, bem como do ratio CD4+/CD8+. A diminuição dos linfócitos CD4+ facilita a infecção dos flebotomos. A sintomatologia manifesta-se, maioritariamente, devido a mecanismos imuno-

mediados, tendo sido detectados complexos imunes e anticorpos anti-nucleares (Baneth, 2010).

Os animais que manifestam sintomatologia desenvolvem uma forte resposta humoral, enquanto os que não manifestam desenvolvem uma resposta celular protectora, mediada por células T, que produzem IL-2, factor de necrose tumoral e IFN- α e os linfócitos CD8+ e CD4+, destroem os macrófagos infectados. (Baneth, 2006).

1.4.7. Ciclo de vida

O ciclo de vida (Figura 8) deste parasita, intra-celular obrigatório, ocorre em duas fases, alternando entre o hospedeiro vertebrado e o flebótomo. Pode ser necessária uma só picada para que ocorra a infecção (Baneth, 2010).

As fêmeas de flebótomo são infectadas quando picam um hospedeiro parasitado, em que as *Leishmania* spp estão nos macrófagos ou no sangue periférico. São infectadas com a forma amastigota, posteriormente convertida em promastigota no intestino médio do vector. De seguida há multiplicação e translocação para o esfago e numa nova refeição os parasitas são regurgitados, infectando o hospedeiro vertebrado (Baneth, 2010).

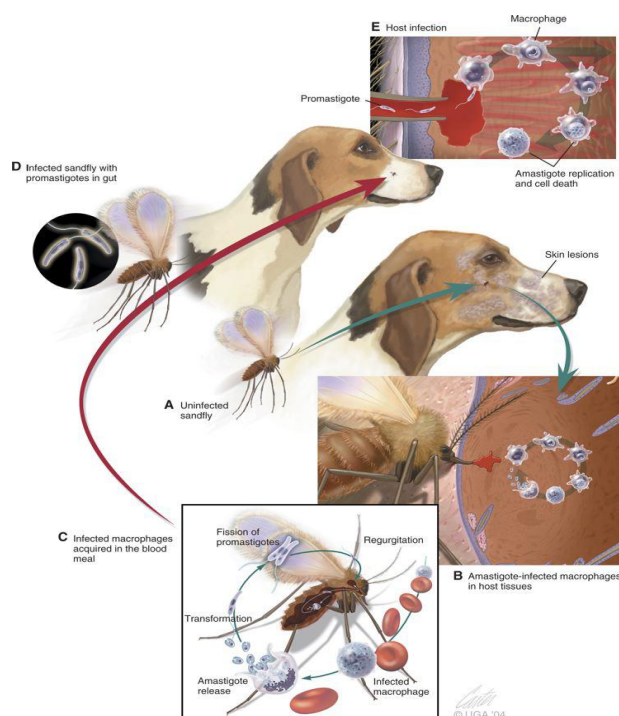


Figura 8 - Ciclo de vida *L. infantum*. Legenda: A – Flebótomo pica cão infectado; B – Formas amastigotas nos macrófagos do cão; C – Macrófagos infectados ingeridos pelo flebótomo; D - Flebótomo infectado com promastigotas no intestino médio; E – Flebótomo infecta outro cão. Adaptado de Baneth (2006)

1.4.8. O cão como hospedeiro reservatório

Em 1908, Nicolle e Comte, descreveram pela primeira vez, na Tunísia, a LC em canídeos da espécie *Canis familiaris* (Pereira, 2002).

O cão é considerado o principal reservatório doméstico e peridoméstico de *L. infantum* nos países do Sul da Europa, Médio Oriente, Ásia e Norte de África (Dujardin *et al.*, 2008) e nos países da América Central e Sul para a *L. chagasi* (Cunha e Chagas, 1937) (Palatnik-de-Sousa & Day, 2011). Muitos autores consideram-nas indistinguíveis (Baneth, 2006).

A sobreposição do habitat do cão com o do homem e o frequente contacto com flebótomos zoo-antropofílicos, torna-o um bom hospedeiro reservatório. Nesta

espécie, a doença tem um desenvolvimento visceral e cutâneo, com inúmeros parasitas na pele, favorecendo a sua transmissão ao vector. O facto de ser uma doença crónica e sazonal, permite a transmissão para a época seguinte, uma vez que tem um longo período de incubação, fazendo com que os sinais clínicos se manifestem mais tarde, embora estes animais sejam infectantes para o vector (Pereira, 2002).

Os cães domésticos mantêm o ciclo doméstico, enquanto o silvático é mantido por cães vadios, selvagens e raposas (Pereira, 2002), contudo alguns consideram que estes ciclos são dependentes, devendo ser considerado como peridoméstico (Moreno & Alvar, 2002).

A existência de animais assintomáticos justifica-se pelo longo período de incubação, que varia de 3 meses a 7 anos, ou pelo desenvolvimento de uma imunidade celular protectora (Pinelli *et al.*, 1994; Cabral *et al.* 1998; Cardoso *et al.*, 1998), sendo muito importantes na perpetuação da doença, pois tornam-se reservatórios do parasita (Abranches *et al.*, 1998). Cerca de 50 a 60% de cães infectados naturalmente e seropositivos de zonas endémicas não manifestaram sintomas (Jambou *et al.*, 1986; Abranches *et al.*, 1991; Brandonisio *et al.*, 1992; Alvar *et al.*, 1994).

1.4.9. Outros hospedeiros reservatórios

Já foram detectados outros hospedeiros, como a raposa, em regiões no Sul de França (Rioux *et al.*, 1968), Itália, Portugal e Espanha (Bettini *et al.*, 1980; Abranches *et al.*, 1984), o chacal (Hervás *et al.*, 1996), o lobo e o rato-negro em Espanha e Itália (Bettini *et al.*, 1980; Pozio *et al.*, 1981). O urso (Garnham, 1965), porco-espinho (WHO, 1980) e guaxinim (Zhi *et al.*, 1984) são considerados hospedeiros acidentais.

Em relação ao papel do gato é um tema ainda controverso, alguns autores consideram-no susceptível à infecção, por ser fonte de alimento para alguns flebótomos (*P. perniciosus*), ter capacidade de armazenar o parasita tornando-se infectantes para o vector e estar presente em áreas onde ocorre o ciclo doméstico e peridoméstico (Vides *et al.*, 2011). Sendo, por isso considerados hospedeiros reservatórios por uns e acidentais por outros (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2008a; Diakou *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2010; Maia & Campino, 2011). O parasita já foi isolado de tecidos felinos em Portugal, Espanha, França, Itália, Argélia e Brasil (Mancianti, 2004).

1.4.10. Factores de risco

Os principais factores considerados de risco para a LC são a idade, que afecta sobretudo animais jovens adultos e idosos (Abranches *et al.*, 1991; Amela *et al.*, 1995; Campino *et al.*, 1995; Cardoso *et al.*, 2004a; Baneth, 2010; Cardoso *et al.*, 2012); a genética, uma vez que a susceptibilidade e resistência à infecção parece ter uma base genética (Ferrer, 1999; Solano Gallego *et al.*, 2000), o ambiente, já que os cães que permanecem mais tempo no exterior estão mais expostos ao vector (Campino, 1995; Cortes *et al.*, 2012) e a raça, sendo as mais susceptíveis o Pastor Alemão (Abranches *et al.*, 1991; Campino *et al.*, 1995; Baneth, 2010), Doberman (Abranches *et al.*, 1991), Perdigueiro (Campino *et al.*, 1995), Boxer, Rottweiler (Baneth, 2010), contrariamente ao Podengo de Ibiza, que parece ser mais resistente à infecção (Solano-Gallego *et al.*, 2000). As raças autóctones são mais resistentes que as importadas/exóticas (Ferrer, 1999; Solano Gallego *et al.*, 2000). Contudo Sousa *et al.* (2011), não encontraram diferenças significativas entre a raça e LC.

A aptidão (Abranches *et al.*, 1991) e o género (Pozio *et al.*, 1981; Sideris *et al.*, 1996; Pereira, 2002; Cardoso *et al.*, 2004a; Shang *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2011) não são considerados factores de risco, embora em França e Brasil alguns autores obtiveram prevalências superiores em machos (Lanotte *et al.*, 1975; Oliveira *et al.*, 2010).

1.4.11. Sinais clínicos

Após a picada do vector infectado, pode ocorrer uma de três situações:

- Não desenvolve a doença e mantém-se saudável;
- É infectado mas não manifesta sinais clínicos ou
- Torna-se sintomático.

Os animais sintomáticos podem conseguir controlar espontaneamente a infecção ou evoluir para doença crónica. Independentemente, todos são susceptíveis de se tornarem infectantes para o vector (Pereira, 2002).

A sintomatologia é bastante variável e a gravidade do quadro depende dos sintomas (Tabela 17), sendo os problemas dermatológicos a principal manifestação.

Alguns cães resistentes, devido à resposta celular local que impede a disseminação dos parasitas, apenas desenvolvem pequenos nódulos no local da inoculação, moderadamente dolorosos, não pruríticos, com remissão ao fim de 1 a 6 meses (Ferrer, 1999).

Tabela 17 - Sinais clínicos e alterações laboratoriais mais comuns na LC

Sinais Clínicos	Alterações Laboratoriais *
Alterações dermatológicas (73,7%)	Hiperproteinémia
Perda de peso (38,2%)	
Onicogribose (19,7%)	Hipergamaglobulinémia
Adenomegália (18,4%)	
Anorexia (9,2%)	Diminuição ratio proteína/albumina
Palidez das mucosas (5,3%)	
Insuficiência renal (5,3%)	Aumento enzimas hepáticas
Epistaxis (5,3%)	
Diarreia (3,9%)	Aumento Creatinina

Legenda - Sintomas obtidos no estudo realizado em Portugal por Cortes *et al.* (2012); *Adaptado de Baneth,

2010

1.4.12. Diagnóstico

Encontram-se disponíveis inúmeros testes de diagnóstico de Leishmaniose, contudo não existe um consenso quanto à sua eficácia, dada a sensibilidade e especificidade inerente a cada um (Tabela 18).

1.4.12.1. Diagnóstico Parasitológico

A citologia (Figura 9) de amostras provenientes da medula óssea e linfonodos e as biópsias de pele são as mais utilizadas (Baneth, 2010, OIE, 2008).

A citologia tem uma sensibilidade muito baixa, para garantir por si só um diagnóstico definitivo, pois apesar da elevada especificidade, a grande dificuldade prende-se com a detecção do parasita nas fases iniciais ou no momento do tratamento bem como na experiência do observador (Roura, 2007).

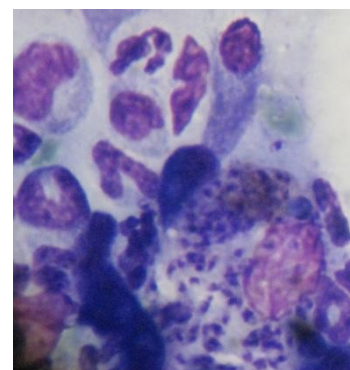


Figura 9 - Citologia *L. infantum*
Foto gentilmente cedida pela
Dra. Vera Pereira

1.4.12.2. Diagnóstico Serológico

Os animais sintomáticos e assintomáticos desenvolvem uma resposta humoral específica, mas não protectora, baseada em IgG, especialmente IgG1 e IgG2 (Fonseca & Brito, 2002).

Apresentam elevada especificidade e sensibilidade (Tabela 18), mas não devem ser utilizados para diagnóstico definitivo isoladamente (Baneth, 2010), uma vez que apenas a pesquisa de anticorpos circulantes pode subestimar o número de cães infectados (Baneth, 2008).

A especificidade e sensibilidade dependem de cada técnica (Tabela 18), sendo as de IFI, Teste de Aglutinação Directa e dot-ELISA, as mais específicas e reprodutíveis (Fonseca & Brito, 2002).

Um resultado serológico positivo ou duvidoso, num animal sem qualquer sintomatologia, pode significar apenas o contacto com o parasita, ou seja, houve infecção, mas poderá nunca vir a manifestar sintomas, mesmo sendo portador (Fonseca & Brito, 2002).

Para as técnicas de IFI e ELISA é necessário saber o cut-off ou limiar da positividade que varia consoante o laboratório, sendo inferior nas zonas endémicas, de 1:50 (Fonseca & Brito, 2002).

O teste de IFI é considerado o teste mais específico e sensível, recomendado pela World Organisation for Animal Health (OIE). No entanto, é impraticável para muitas amostras e não existe consenso quanto ao cut-off, bem como a possibilidade de ocorrerem falsos negativos, já que para os anticorpos serem detectados, têm de estar em concentrações suficientes (Fonseca & Brito, 2002).

Contudo, para seguimento de tratamento não é o mais indicado, pois os anticorpos podem permanecer por um longo período após recuperação. A diminuição do título não significa a cura, porque muitos podem manter um título elevado ou diminuído durante o tratamento (Fonseca & Brito, 2002).

A técnica de ELISA é mais utilizada para estudos epidemiológicos, pois exigem uma grande quantidade de amostras. Apesar da sua sensibilidade e especificidade (Tabela 18), podem ocorrer falsos positivos (Fonseca & Brito, 2002). No Homem e no cão, utiliza-se um antigénio para ELISA, o rk39, para detecção de leishmaniose visceral por *L. infantum* (Baneth, 2010).

No WB, Riera *et al.* (1999) e Rhalem *et al.* (1999) comprovaram que a diminuição dos valores da titulação e do número e/ou intensidade das bandas moleculares coincidem com a melhoria clínica dos animais tratados.

1.4.12.3. Diagnóstico Molecular

O método molecular considerado mais sensível e específico é o PCR (Maia *et al.*, 2006). No entanto, não reflecte a severidade nem a fase da doença (Moreira *et al.*, 2007). Esta técnica baseia-se na amplificação de ADN do parasita, é rápida e permite estudar amostras menos recentes (Fonseca & Brito, 2002).

Qualquer amostra pode ser utilizada, sendo as mais comuns provenientes da medula óssea, linfonodos, fígado, baço e sangue (Fonseca & Brito, 2002).

Nas fases iniciais da doença, o PCR é mais sensível e nas fases mais avançadas é a serologia, tanto para animais sintomáticos como assintomáticos (Quinnel *et al.*, 2001).

A citologia com amostras provenientes de linfonodos é mais útil como diagnóstico inicial ou seguimento de tratamento, enquanto a de medula óssea deverá ser utilizada caso os poplíteos não sejam palpáveis (Maia & Campino, 2008b). O PCR é útil em casos duvidosos e para detectar persistência de infecção em animais tratados, clinicamente curados e portadores crónicos. No entanto, as técnicas não quantitativas apresentam pouco valor diagnóstico já que apenas revelam se o animal tem ou não a doença (Fonseca & Brito, 2002).

Podem ocorrer falsos negativos sobretudo em cães assintomáticos, já os falsos positivos podem ocorrer por infecções concomitantes ou contaminação natural (Maia & Campino, 2008b).

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) permite obter valores quantitativos de modo a avaliar as variações da carga parasitária e a resposta à terapêutica (Fonseca & Brito, 2002). O qPCR é aconselhado utilizar quando a serologia é inconclusiva, quando ainda não há seroconversão e para monitorização do tratamento (Martínez *et al.*, 2011).

Tabela 18 - Sensibilidade e especificidade dos vários métodos de diagnóstico

Teste	Local	Sensibilidade %	Especificidade %	Autor
Citologia	Medula Óssea	60-75	SR	Ferrer, 1999; Alvar <i>et al.</i> (2004)
		50-70	SR	Roura (2007)
	Linfonodos	30-50	SR	Ferrer (1999); Alvar <i>et al.</i> (2004)
		≈30	SR	Roura (2007)
Serologia				
IFI		85,5	94,7	Maia <i>et al.</i> (2007)
		96	98	OIE (2008)
TAD		70,6	SR	Mohebbali <i>et al.</i> (2004)
		100	SR	Silva <i>et al.</i> (2006)
		100	Neogy <i>et al.</i> (1992); Schallig <i>et al.</i> (2002a)	
FAST		93,6-97,7	89-93	Schallig <i>et al.</i> (2002b;2004)
ELISA		100	90,5	Fonseca & Brito,(2002)
		94,1-100 *	SR	Mettler <i>et al.</i> (2005)
		100 **		
		dot-ELISA	Baço	
100 **	100 **			Fisa <i>et al.</i> (1997)
Método Molecular				
PCR	Baço	88,9		Solcá <i>et al.</i> (2012)

Legenda - Esta tabela refere-se à sensibilidade e especificidade dos vários testes de diagnóstico de *L. infantum*. *Animais assintomáticos; **Animais sintomáticos; SR- Sem referência

1.4.12.4. Outros métodos de diagnóstico

Para além dos referidos anteriormente existem muitos outros, menos utilizados na rotina clínica, como a cultura, mais utilizada na investigação (Fonseca & Brito, 2002), a histopatologia, que tem baixa sensibilidade devido à dificuldade na observação dos parasitas (Xavier *et al.*, 2006), a imunohistoquímica, mais utilizada como suplemento para confirmar o diagnóstico (Maia & Campino, 2008b) e a Reacção de Montenegro, que consiste na inoculação intradérmica do antigénio (Leishmanina) (Fonseca & Brito, 2002) e o xenodiagnóstico, realizado no próprio vector, sendo mais utilizado em estudos epidemiológicos (Maia & Campino, 2008b).

1.4.13. Importância zoonótica em Portugal

Dionísio Alves diagnosticou, pela primeira vez em 1910, Leishmaniose numa criança de 9 anos residente em Lisboa (Campino & Maia, 2010).

Anualmente, em Portugal, são notificados cerca de 15 casos de Leishmaniose Humana à Direcção Geral de Saúde (DGS). Entre 2001 e 2005 a DGS referiu que são notificados cerca de 10 casos de Leishmaniose Humana na região do Norte e 43 em Lisboa e Vale do Tejo (Pereira, 2002). Entre 2000 e 2009 foram diagnosticados 173 novos casos de Leishmaniose Visceral Humana, mas à DGS foram notificados apenas 133, o que denota uma subnotificação da doença, apesar de ser de declaração obrigatória desde os anos 50. Dados oficiais da DGS, revelaram que a região do Alto Douro era o foco mais activo da infecção humana até 1991 (Campino & Maia, 2010).

1.5. Breve revisão sobre os ixodídeos existentes em Portugal

Os ixodídeos, pertencentes à família *Ixodidae* são artrópodes ectoparasitas hematófagos e são veículos na transmissão de inúmeros agentes patogénicos (Silva *et al.*, 2006).

A sua eficácia como vector depende fundamentalmente de dois parâmetros, a capacidade vectorial, que é a capacidade de transmitir, no tempo e espaço, um agente patogénico e a competência do vector, que é a capacidade intrínseca em manter a infecção e transmiti-la durante a alimentação (Silva *et al.*, 2006).

Como algumas doenças partilham o mesmo vector, é frequente a pesquisa de hemoparasitas em perfis.

1.5.1. Ixodídeos existentes em Portugal

A família mais comum é a *Ixodidae*, deste modo serão abordados os vectores existentes pertencentes à mesma (Santos-Silva *et al.*, 2011).

Santos-Silva *et al.* (2011) estudaram a fauna de ixodídeos existente no País, dividido em 18 regiões administrativas, tendo sido recolhidas 15044 carraças em animais domésticos, selvagens e da vegetação, como referido na Tabela 19.

Tabela 19 - Ixodídeos existentes em Portugal (Santos-Silva *et al.*, 2011)

Espécie	Nº Regiões de captura
<i>R. sanguineus</i>	15
<i>Ixodes ricinus</i>	11
<i>Dermacentor marginatus</i>	11
<i>Hyalomma marginatum</i>	10
<i>Ixodes hexagonus</i>	10
<i>R. pusillus</i>	10
<i>R. bursa</i>	9
<i>Hyalomma lusitanicum</i>	8
<i>D. reticulatus</i>	6
<i>I. ventraloi</i>	5
<i>Haemaphysalis punctata</i>	4

Legenda – Espécies de Ixodídeos existentes em Portugal, estudo realizado por Santos-Silva *et al.*, 2011

1.5.2.1. Género *Rhipicephalus*

A espécie *R. sanguineus* (Figura 10) ocorre em Portugal, com maior actividade e densidade nos meses de Julho e Agosto, daí a importância da temperatura na sua actividade, ao contrário da humidade relativa que não tem qualquer influência, sobrevivendo facilmente em ambientes secos. Os adultos são encontrados em qualquer altura do ano, com um pico na Primavera e Verão, enquanto as formas imaturas têm maior actividade nos meses de Verão.

Santos-Silva *et al.* (2011) recolheram os adultos da vegetação, mamíferos domésticos e selvagens; as ninfas de carnívoros, insectívoros, ungulados e roedores e as larvas de carnívoros e insectívoros (Silva *et al.*, 2006).

Esta espécie pode transmitir agentes como a *B. canis vogeli*, *E. canis*, *A. platys*, *R. conorii* e *R. massiliae* (Santos-Silva *et al.*, 2011).



Figura 10 - Fêmea de *R. sanguineus*
[www. cvbd.org](http://www.cvbd.org)

1.5.2.2. Género *Ixodes*

A espécie com maior interesse é o *I. ricinus* e está muito dependente do estado higrométrico do ar e temperatura, sendo essencial este equilíbrio. Assim, a sua sazonalidade justifica a frequência das doenças associadas, uma vez que os adultos têm maior actividade nos meses menos quentes (Setembro a Março), cessando actividade no Verão, enquanto as formas imaturas têm maior actividade entre a Primavera e Verão (Abril a Julho) (Silva *et al.*, 2006).



Figura 11 – Fêmea de *I. ricinus* (CVBD 2008)

Em Portugal, a sua distribuição não é igual em todo o país, no entanto é possível encontrá-la de Norte a Sul, especialmente em zonas com muita vegetação e elevados níveis de humidade (Silva *et al.*, 2006). Santos-Silva *et al* (2011) recolheram os adultos e as formas imaturas da vegetação, mamíferos domésticos (apenas adultos) e selvagens e do Homem, denotando a sua grande capacidade de adaptação a uma variedade de hospedeiros.

Foi também encontrada a espécie *I. ventralloi*, nos distritos de Beja, em Moura, de Lisboa, em Mafra, Loures, Sintra, Amadora e Lisboa e Setúbal, em Alcácer do Sal. Os adultos foram recolhidos da vegetação, mamíferos domésticos e selvagens e pássaros, enquanto as ninfas encontravam-se na vegetação, roedores e pássaros. As recolhas feitas em pássaros, cães, gatos e o rato preto são novos achados. Esta espécie pode transmitir *A. phagocytophilum* (Santos *et al*, 2004) e *R. helvética* (Santos-Silva *et al.*, 2011).

1.5.2.3. Género *Dermacentor*

O habitat ideal consiste num clima temperado e seco, mas facilmente suporta temperaturas mais elevadas, sendo pouco exigente quanto à humidade. As formas imaturas têm maior actividade na Primavera e Verão e os adultos no Outono e Inverno, contudo podem ser encontrados durante todo o ano (Silva *et al.*, 2006).



Figura 12 – Fêmea de *D. reticulatus* CVBD (2009)

A espécie *D. reticulatus* (Figura 12), associado à transmissão de *Babesia* spp no cão e *Francisella tularensis* no Homem, é encontrada em Aveiro, Bragança, Castelo Branco, Leiria, Lisboa, Porto, Vila Real e Viseu (Santos-Silva, *et al.*, 2011).

A espécie *D. marginatum* está descrita em quase todo o território Nacional e transmite *Rickettsia slovaca* e *Borrelia lusitaniae* (Santos-Silva, *et al.*, 2011).

Em ambas as espécies, os adultos foram isolados da vegetação, mamíferos domésticos e selvagens (ungulados, carnívoros), contudo o *D. marginatum* foi também isolado a partir do Homem (Santos-Silva, *et al.*, 2011).

1.5.2.4. Género *Hyalomma*

As espécies descritas em todo o território Nacional foram o *H. lusitanicum*, que transmite a *B. burgdorferi*, sendo os adultos recolhidos da vegetação, mamíferos domésticos e selvagens (ungulados, insectívoros e carnívoros), Homem, pombos e corços, enquanto os adultos de *H. marginatum* encontravam-se na vegetação, ungulados e esporadicamente no Homem. As ninfas e larvas de *H. lusitanicum* têm como hospedeiros principais roedores, lagomorfos e insectívoros enquanto as formas imaturas de *H. marginatum* têm os pássaros e lebres como principais hospedeiros (Santos-Silva *et al.*, 2011).

Adaptados a climas quentes e secos, sendo por isso pouco exigente do ponto de vista higrométrico, as formas adultas têm maior actividade na Primavera e Verão enquanto as imaturas no Outono e Inverno (Silva *et al.*, 2006).

1.6. Co – Infecções

Os diversos agentes patogénicos podem partilhar o mesmo vector, daí que um animal possa estar infectado com apenas um ou vários agentes em simultâneo, sendo um factor importante no decorrer da doença, diagnóstico e tratamento. Este fenómeno ocorre sobretudo em áreas endémicas, dependendo da abundância dos vectores (Kramer, 2007).

As infecções concomitantes entre *Anaplasma* spp, *Ehrlichia* spp, *Rickettsia* spp e *Bartonella* spp são bastante frequentes (Kramer, 2007).

Em Portugal são vários os estudos em que foram diagnosticadas infecções concomitantes, nomeadamente entre *B. canis canis* e *L. infantum*, *B. canis canis* e *Hepatozoon canis*, *B. canis vogeli*, *E. canis* e *L. infantum* (Cardoso *et al.*, 2010a), *B. canis vogeli* e *A. platys* (Cardoso *et al.*, 2008b).

1.7. Outras doenças transmitidas por vectores existentes em Portugal

Para além das doenças referidas anteriormente, existem outras que partilham os mesmos vectores, nomeadamente o *R. sanguineus* e o *I. ricinus*, mas que não foram diagnosticadas durante o período de estágio.

A existência destes vectores possibilita a transmissão de outros agentes, como *A. platys* (Cardoso *et al.*, 2008b; Cardoso *et al.*, 2012), *A. phagocytophilum*

(Figueiredo, 2007; Santos *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2012), *Hepatozoon canis* (Figueiredo, 2007; Cardoso *et al.*, 2010b), *Borrelia burgdorferi* (Doença de Lyme) (Cardoso *et al.*, 2012) (Tabela 20). A *Dirofilaria immitis*, responsável pela Dirofilariose, é transmitida por membros da família *Culicidae* e ocorre no País (Cardoso *et al.*, 2012) (Tabela 20).

Tabela 20 - Doenças transmitidas por vectores

Vector	Agente	Doença	Células-alvo	Distribuição	Zoonose	Autor
R. sanguineus	<i>Anaplasma platys</i>	Trombocitopénia cíclica infecciosa	Plaquetas	Mediterrâneo, Ásia, África, Austrália, Estados Unidos, Médio Oriente	Não	Santos <i>et al.</i> 2009
	<i>Hepatozoon canis</i>	Hepatozoonose	Leucócitos	Sul da Europa, Médio Oriente, Ásia e Estados Unidos.	Não	Kramer, 2011
I. ricinus	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Doença de Lyme	Sem células alvo	Europa Central e Ocidental	Sim	Greene & Straubinger, 2006
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Anaplasmose Canina; Anaplasmose Granulocítica	Neutrófilos	Hemisférios Norte da Europa e América, Ásia e África	Sim	Kohn <i>et al.</i> 2008
Mosquitos género - Culex, Aedes, Anopheles	<i>Dirofilaria immitis</i>	Dirofilariose canina	Sem células alvo	Europa, Estados Unidos, Japão, Austrália	Sim	McCall <i>et al.</i> 2008

Legenda – Na tabela estão referidas outras doenças transmitidas por vectores que ocorrem em Portugal.

1.8. Objectivos

O objectivo geral do presente estudo foi determinar a incidência das doenças transmitidas por vectores, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* e *Leishmania infantum*, numa clínica veterinária, em cães pertencentes ao concelho de Cascais. E os objectivos específicos foram identificar a influência dos factores idade, época do ano, género e raça no diagnóstico dos vários agentes.

2. Material e Métodos

Foi realizado um estudo retrospectivo de hemoparasitoses, compreendendo dados do período entre 1 de Janeiro de 2010 e 29 de Fevereiro de 2012, em canídeos habitantes no concelho de Cascais. Foram por isso excluídos todos os canídeos que não habitam neste concelho.

A amostra foi obtida a partir da base de dados da clínica em questão, sendo o diagnóstico realizado em dois laboratórios externos, o Segalab® ou o DNA Tech®. Os principais critérios de inclusão para que sejam considerados animais suspeitos de *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp e *Rickettsia* spp foram febre, prostacção e trombocitopenia. Já para a LC muitas das pesquisas são realizadas apenas por rotina, não havendo por isso critérios específicos de inclusão.

2.1. Método Analítico

O método analítico utilizado foi a IFI para pesquisa de anticorpos contra *B. canis*, *E. canis*, *R. conorii* e *L. infantum*. Em apenas uma amostra foi utilizado o PCR, após realização de IFI para pesquisa de *L. infantum*.

2.2. Limiar da Positividade da técnica IFI

O limiar da positividade varia consoante o laboratório, sendo avaliada pelo operador a fluorescência a partir da qual a amostra é positiva. De acordo com o Segalab®, considera-se positivo a *E. canis* se valor superior a 1:10, para *B. canis* a partir de 1:64, *L. infantum* de 1:80 e *R. conorii* de 1:64. Segundo o DNA Tech®, considera-se positivo a *E. canis* a partir de 1:50, *B. canis* de 1:32, *L. infantum* de 1:160 e *R. conorii* de 1:64.

2.3. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada no SPSS (Statistical Package for Social Sciences) e os resultados foram considerados significativos quando o *p*-value (significância) foi inferior a 0,05. Para avaliar se existia relação entre o diagnóstico destes agentes e o sexo, época do ano e raça, foi efectuado o Teste Exacto de Fisher. Na avaliação da variável numérica, a idade, efectuaram-se os testes de normalidade de Shapiro-Wilk quando amostras inferiores a 50 e Kolmogorov-Smirnov quando superiores a 50. Quando a normalidade foi constatada aplicou-se uma abordagem paramétrica: Teste T para amostras independentes. Quando o pressuposto de aplicação do Teste T, normalidade e homocedastecidade, não foram constatadas aplicou-se o teste não paramétrico de

Mann-Whitney. Assim, para avaliar a influência da idade no diagnóstico destes agentes utilizaram-se o Teste T e Mann-Whitney.

Adicionalmente, para efeito de análise, as variáveis da estação do ano foram reclassificadas em meses quentes (Primavera e Verão) e frios (Outono e Inverno) e as raças em pura e indeterminada.

Para todos os agentes foi determinada a razão de riscos dos factores em estudo e quando este é inferior a 1 considera-se factor protector e se superior a 1 factor de risco.

3. Resultados

3.1. Avaliação Global

Foram analisadas 207 amostras, das quais 42 foram testadas para Babesiose, 43 para Ehrlichiose, 46 para Rickettsiose e 190 para Leishmaniose.

A Leishmaniose foi a doença em que se verificou o maior número de casos positivos (n=53), seguida da Rickettsiose (n=40). Na Babesiose foram obtidos 8 casos positivos e na Ehrlichiose foram obtidos o menor número de casos (n=4).

Foram verificadas co-infecções com *Rickettsia conorii* e *Ehrlichia canis* (n=4), *Rickettsia conorii* e *Babesia canis* (n=8) e *Leishmania infantum* e *Rickettsia conorii* (n=2) (Figura 13).

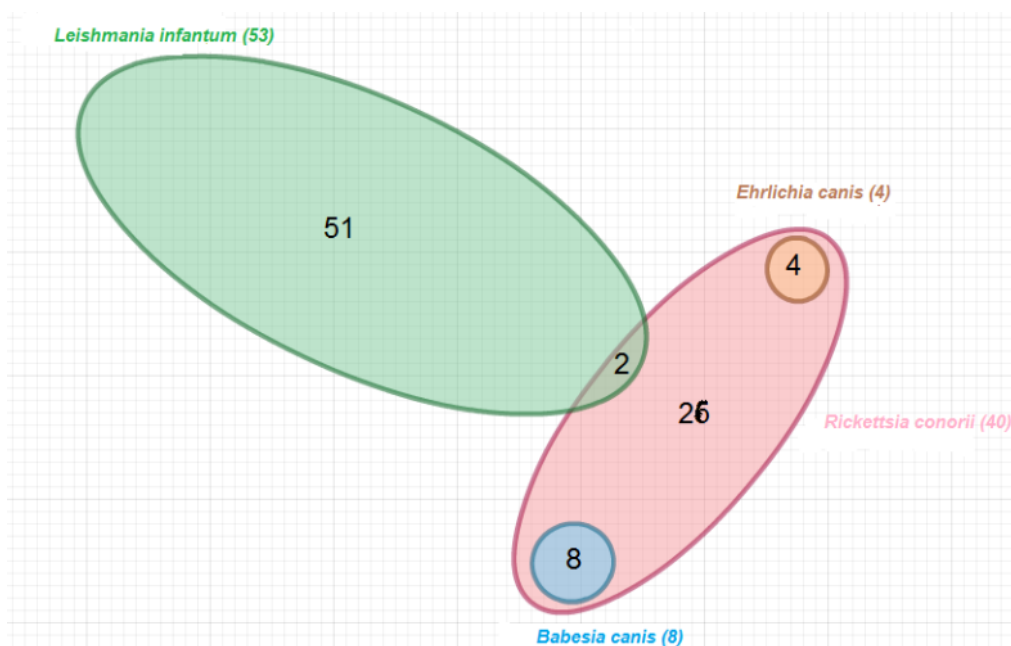


Figura 13 - Diagrama de Venn com quatro variáveis relacionando o número de infectados e as co-infecções

3.1.1. Percentagem de canídeos suspeitos positivos

Para cada agente foi determinada a proporção de canídeos suspeitos com resultados positivos, sendo a *R. conorii* o agente com maior percentagem com 86,9%, seguida da *L. infantum* com 27,89%, a *B. canis* com 19,05% e a *E. canis* com 9,3% (Tabela 21).

Tabela 21 - Proporção dos animais suspeitos positivos a *B. canis*, *E. canis*, *R. conorii* e *L. infantum*

Agente	Proporção nos suspeitos positivos %	Positivos	Total
<i>B. canis</i>	19,05	8	42
<i>E. canis</i>	9,3	4	43
<i>R. conorii</i>	86,9	40	46
<i>L. infantum</i>	27,89	53	190

3.1.2. Idade

A média de idades nos canídeos positivos a *B. canis* foi de 7,9 anos, com variação entre 1 e os 15 anos de idade, nos positivos a *E. canis* a média foi de 8 anos, sendo a idade mínima 5 anos e a máxima 14 anos, para a *R. conorii*, os positivos apresentaram uma média de idade de 6,9 anos, em que a idade mínima foi de 1 ano e a máxima de 16 anos e na *L. infantum*, a média foi de 8,5 anos nos positivos, sendo a idade mínima 1 ano e a máxima 15 anos (Tabela 22).

Para avaliar a influência da idade, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, que sugere que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a idade e o diagnóstico destes agentes, já que o *p* foi superior a 0,05 para todos (Tabela 22).

Tabela 22 - Média de Idades dos canídeos da amostra em estudo

Agente	Média de Idades (anos)	Mín - Máx	<i>p</i> -value
<i>B. canis</i>			
Positivo	7,9	1 - 15	0,235
<i>E. canis</i>			
Positivo	8	5 - 14	0,504
<i>R. conorii</i>			
Positivo	6,86	1 - 16	0,053
<i>L. infantum</i>			
Positivo	8,5	1 - 15	0,319

3.1.3. Época

Para todos os agentes em estudo, as suspeitas foram superiores nos meses quentes do que nos frios (Tabela 23). Mais especificamente, para a *B. canis* as suspeitas nos meses quentes foram de 67% (28/42) e nos frios de 33% (14/42), para a *E. canis* foi de 67% (29/43) nos meses quentes e 33% (14/43) nos frios, para a *R. conorii* foi de 65% (30/46) nos meses quentes e 35% (16/46) nos frios e para a

L. infantum foi de 52% (99/190) nos meses quentes e 48% (91/190) nos frios (Tabela 23).

Para a *B. canis*, foi obtida uma percentagem de positivos de 21% (6/28) nos meses quentes e de 14% (2/14) nos meses frios, para a *E. canis* foi de 7% (2/29) nos meses quentes e de 14% (2/14) nos meses frios, para a *R. conorii* foi de 93% (28/30) nos quentes e 75% (12/16) nos frios e para a *L. infantum* foi de 27% (27/99) nos quentes e 29% (26/91) nos frios (Tabela 23).

Efectuou-se a razão de riscos (odd's ratio) entre os meses quentes e frios e este teste sugere que não há diferenças estatisticamente significativas entre a época e o diagnóstico destes agentes.

Para a *L. infantum* (Tabela 24) e *R. conorii* (Tabela 25), foram discriminados os números de casos por mês, já que foram os agentes com mais casos. Os meses em que foram diagnosticados mais casos de *R. conorii* foram Maio com 9 casos, Junho com 5 e Agosto com 6 e para a *L. infantum* foram Janeiro com 9 casos, Julho e Agosto com 6 cada, Setembro e Outubro com 7 cada.

Tabela 23 - Relação entre o número de positivos a *B. canis*, *E. canis*, *R. conorii* e *L. infantum* e época do ano

	Quentes	Frios	Total
<i>B. canis</i>			
Negativo	22	12	34
Positivo	6	2	8
	28	14	42
<i>E. canis</i>			
Negativo	27	12	39
Positivo	2	2	4
	29	14	43
<i>R. conorii</i>			
Negativo	2	4	6
Positivo	28	12	40
	30	16	46
<i>L. infantum</i>			
Negativo	72	65	137
Positivo	27	26	53
	99	91	190

Tabela 24 - Casos mensais de *L. infantum*

Casos/mês	Positivo	Negativo	Total
Janeiro	9	12	21
Fevereiro	1	14	15
Março	3	6	9
Abril	2	4	6
Maio	1	9	10
Junho	4	23	27
Julho	6	14	20
Agosto	6	11	17
Setembro	7	11	18
Outubro	7	11	18
Novembro	4	14	18
Dezembro	3	8	11
	53	137	190

Tabela 25 - Casos mensais de *R. conorii*

Casos/mês	Positivo	Negativo	Total
Janeiro	1		1
Fevereiro	3		3
Março	1		1
Abril	1		1
Maio	9		9
Junho	5	1	6
Julho	2		2
Agosto	6	1	7
Setembro	4		4
Outubro	2	1	3
Novembro	4	2	6
Dezembro	2	1	3
	40	6	46

3.1.4. Género

Os resultados apresentados evidenciam que o género masculino obteve um maior número de suspeitas quando comparado ao feminino, para todos os agentes em estudo (Tabela 26). Para a *B. canis* a proporção de suspeitos foi de 59,52% (25/42) no masculino e 40,48% (17/42) no feminino, para a *E. canis* foi de 60,47% (26/43) no masculino e 39,53% (17/43) no feminino, para a *R. conorii* foi de 58,7% (27/46) no masculino e 41,3% (19/46) no feminino e para a *L. infantum* foi de 65,79% (125/190) no masculino e 34,21% (65/190) no feminino (Tabela 26).

A proporção de cães positivos a *B. canis* foi superior no género masculino com uma proporção de 24% (6/25), comparativamente com o género feminino com

12% (2/17), para a *E. canis* foi de 3,8% (1/26) nos machos e 17,6% (3/17) nas fêmeas, para a *R. conorii* foi de 88,9% (24/27) nos machos e de 84% (16/19) nas fêmeas e para a *L. infantum* foi de 30% (38/125) nos machos e de 23% (15/65) nas fêmeas (Tabela 26).

Efectuou-se a razão de riscos (odd's ratio) entre o género e este teste sugere que não há diferenças estatisticamente significativas entre o género e o diagnóstico destes agentes.

Tabela 26 - Relação entre *B. canis*, *E. canis*, *R. conorii* e *L. infantum* e o género

	M	F	Total
<i>B. canis</i>			
Negativo	19	15	34
Positivo	6	2	8
	25	17	42
<i>E. canis</i>			
Negativo	25	14	39
Positivo	1	3	4
	26	17	43
<i>R. conorii</i>			
Negativo	3	3	6
Positivo	24	16	40
	27	19	46
<i>L. infantum</i>			
Negativo	87	50	137
Positivo	38	15	53
	125	65	190

3.1.5. Raça

Para todos os agentes, as suspeitas foram superiores nos canídeos de raça pura comparativamente aos de raça indeterminada (Tabela 27). A percentagem de suspeitos para a *B. canis* foi de 69% (29/42) nos canídeos de raça pura e 31% (13/42) para os de raça indeterminada, para a *E. canis* foi de 67% (29/43) para os de raça pura e 32,6% (14/43) para os de raça indeterminada, para a *R. conorii* foi de 70% (32/46) para os de raça pura e 30% (14/46) para os de raça indeterminada e para a *L. infantum* foi de 70% (133/190) para os de raça pura e 30% (57/190) para os de raça indeterminada (Tabela 27).

Em relação à raça, a proporção de cães positivos para a *B. canis* foi de 13,8% (4/29) nos de raça pura e de 30,7% (4/13) nos de raça indeterminada, para a *E. canis* a proporção de cães positivos foi de 6,9% (2/29) nas raças puras e de 14% (2/14) nas de raça indeterminada, para a *R. conorii* foi de 84% (27/32) nos de raça pura e de 92,9% (13/14) nos de raça indeterminada e para a *L. infantum* foi de 24% (32/133) nos de raça pura e de 36,8% (21/57) nos de raça indeterminada (Tabela 27).

As raças mais representativas em cada amostra estão referidas nas figuras abaixo (Figura 14,15,16,17).

Efectuou-se a razão de riscos (odd's ratio) para a raça e este teste sugere que não há diferenças estatisticamente significativas entre a raça e o diagnóstico destes agentes.

Tabela 27 - Relação entre *B. canis*, *E. canis*, *R. conorii* e *L. infantum* e a raça

	Pura	Indeterminada	Total
<i>B. canis</i>			
Negativo	25	9	34
Positivo	4	4	8
	29	13	42
<i>E. canis</i>			
Negativo	27	12	39
Positivo	2	2	4
	29	14	43
<i>R. conorii</i>			
Negativo	5	1	6
Positivo	27	13	40
	32	14	46
<i>L. infantum</i>			
Negativo	101	36	137
Positivo	32	21	53
	133	57	190

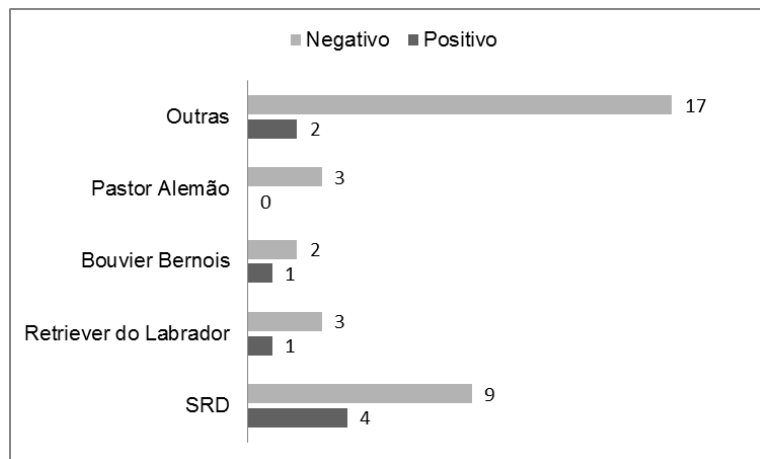


Figura 14 - Raças mais representativas no diagnóstico de *Babesia canis*

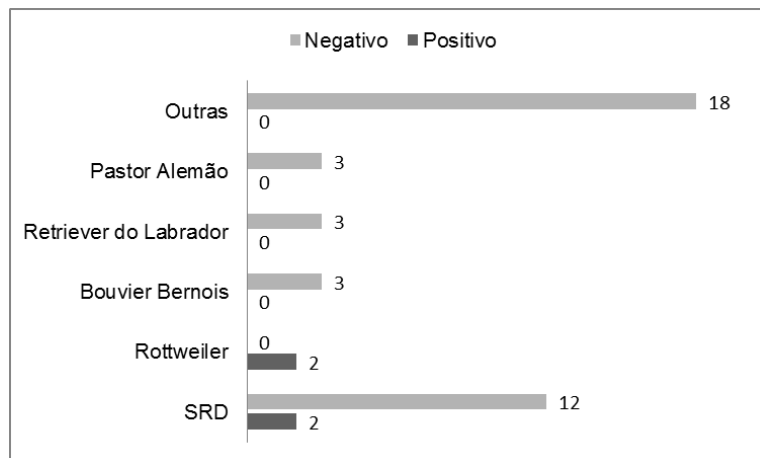


Figura 15 - Raças mais representativas no diagnóstico de *Ehrlichia canis*

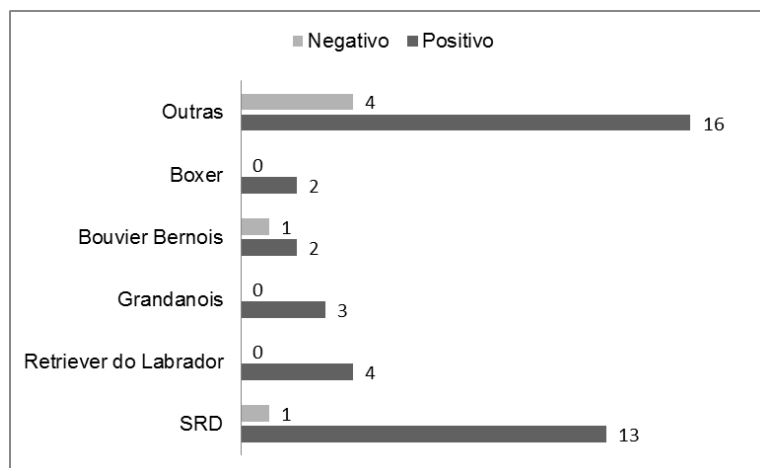


Figura 16 - Raças mais representativas no diagnóstico de *Rickettsia conorii*

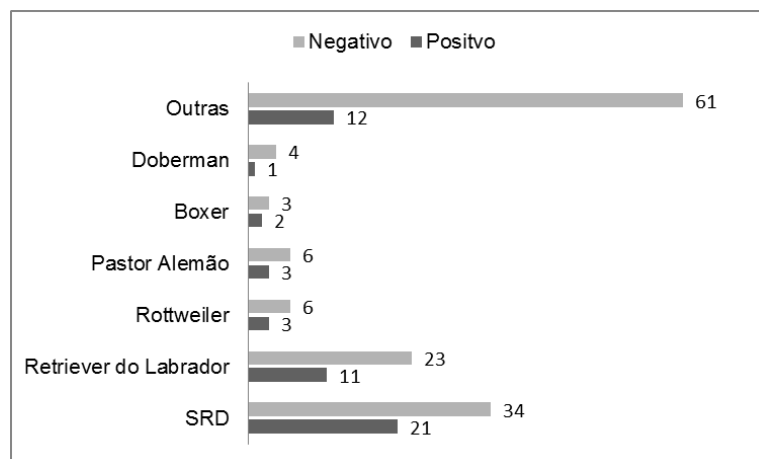


Figura 17 - Raças mais representativas no diagnóstico de *Leishmania infantum*

3.2. Influência da época do ano, género e raça no diagnóstico de *B. canis*, *E. canis*, *R. conorii* e *L. infantum*

Tal como referido na tabela 28, a relação entre o diagnóstico de *B. canis*, *E. canis*, *R. conorii* e *L. infantum* e factores como a época de diagnóstico, género e raça foi calculada através do teste Exacto de Fisher, que mostrou não haver relação entre estes parâmetros e o diagnóstico destes agentes, para um nível de significância de 5%.

Tabela 28 - Valores de *p* calculado através do teste Exacto de Fisher

Agente	Época	Sexo	Raça
<i>B. canis</i>	$p=0,697^*$	$p=0,439^*$	$p=0,226^*$
<i>E. canis</i>	$p=0,585^*$	$p=0,284^*$	$p=0,585^*$
<i>R. conorii</i>	$p=0,155^*$	$p=0,672^*$	$p=0,647^*$
<i>L. infantum</i>	$p=0,872^*$	$p=0,393^*$	$p=0,08^*$

Legenda: *Não significativo

4. Discussão

4.1. Babesiose Canina por *Babesia canis*

Na amostra em estudo foi obtida uma proporção de canídeos positivos a *Babesia canis* de 19%, valor bastante inferior ao obtido por Menn *et al.* (2010), de 58% em canídeos portugueses, pertencentes a canis, com o mesmo método de diagnóstico. Esta discrepância poderá ser o resultado do tipo de amostra, sendo os animais desse estudo pertencentes a canis e por isso com um risco de infecção bastante superior. Em contradição, o resultado obtido no presente estudo foi superior ao obtido por Hornok *et al.* (2006) na Hungria, com 6% de um total de 651 cães provenientes de ambientes urbanos e rurais, o que poderá ser explicado pelas diferenças existentes em termos de clima, presença dos vectores, geografia e condições sócio-económicas entre os dois países.

A média de idades da amostra dos canídeos infectados neste estudo foi de 8 anos, contrariamente ao verificado por Nulabamba *et al.* (2011) em que canídeos com menos de 1 ano têm maior probabilidade de desenvolver infecção. No entanto, esse estudo foi realizado na Zâmbia, e provavelmente o risco de infecção é mais alto, devido a vários factores como as condições climáticas, a presença de vectores e as condições ambientais em que os cães vivem.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a época do ano e a proporção de cães infectados. Estes resultados não estão de acordo com os de Diz-Lopes & Rodrigues (2009), no Nordeste Transmontano, onde detectaram uma ocorrência superior em meses mais frios, em Outubro e Novembro, bem como Cardoso *et al.* (2010) no Norte de Portugal. Já Nalubamba *et al.* (2011) na Zâmbia, obtiveram dois picos, um na época da chuva e outro na época seca. O valor obtido no presente estudo poderá ser explicado pelo facto do vector *R. Sanguineus* poder ser encontrado durante todo o ano, mesmo que o seu clima ideal seja um clima quente, apresentando por isso uma suposta maior densidade em Julho e Agosto (Silva *et al.*, 2006).

Este estudo revela ainda que as suspeitas dos Médicos Veterinários recaem sobretudo nos meses quentes. A pesquisa de *Babesia* spp e dos restantes hemoparasitas é requisitada pelos clínicos perante um animal com sintomatologia sugestiva e não como um teste de rotina, como acontece na Leishmaniose. No entanto, estes sintomas não são específicos, podendo ser encontrados com muitas outras doenças. Neste estudo os resultados indicam que apesar do maior número de suspeitos, o número de cães infectados não é estatisticamente diferente dos encontrados nos meses frios, sugerindo que nos meses quentes, devido às

elevadas temperaturas e pelo facto de ser o clima ideal do vector, o clínico está mais sugestionado a requisitar estas análises, levando a uma maior percentagem de suspeitos negativos.

Relativamente ao género, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação à proporção de animais infectados. Num estudo de Mellanby *et al.* (2011) constatou-se que machos inteiros, castrados e fêmeas esterilizadas apresentavam um risco superior quando comparadas a fêmeas inteiras. Neste estudo não há referência destes parâmetros, não se podendo por isso, relacionar. Estes resultados são de difícil interpretação uma vez que se desconhece a percentagem de machos e fêmeas desta clínica.

Em relação à raça, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre a proporção de cães positivos nas raças puras comparativamente com as raças indeterminadas. Diz-Lopes *et al.* (2009) obtiveram uma percentagem de 62% nos cães de caça, em que 52% eram Podengos, diferindo do presente estudo, Cardoso *et al.* (2010) obtiveram uma percentagem superior em Podengos, Rafeiros e Epagneul Breton e Mellanby *et al.* (2011) constataram que o risco de infecção é inferior em raças *toy* comparativamente a Labradores Retrievers. No presente estudo partiu-se de uma população heterogénea de base hospitalar na qual a prevalência de cada raça e das raças indeterminadas é desconhecida, sendo por isso impossível concluir se uma determinada raça tem ou não maior risco de infecção. No entanto observou-se que a maioria das suspeitas ocorreu em canídeos de raça, sendo o Labrador Retriever a raça mais representativa da amostra, com 3 suspeitas, mas apenas uma positiva. Os canídeos de raça indeterminada revelaram um número de suspeitas inferior, mas igual número de infectados, 4. Estes resultados podem ser devido ao acaso, mas podem levantar a hipótese de que nesta amostra, proveniente da zona de Cascais, a prevalência de cães de raça ser superior aos de raça indeterminada.

4.2. Ehrlichiose Canina por *Ehrlichia canis*

Na amostra em estudo a proporção de canídeos positivos a *Ehrlichia canis* foi de 9%, semelhante ao obtido por Figueiredo (2007) com 15% e Menn *et al.* (2010) em cães de canil, com 9%, ambos por IFI. Já em relação ao de Bacellar *et al.* (1995) no canil de Setúbal, que foi de 50%, também por IFI, foi muito inferior. A explicação poderá residir no ambiente em que os canídeos vivem e na prevenção contra ectoparasitas (Dantas-Torres, 2010), já que no estudo de Bacellar *et al.*

(1995) foram testados cães de canil, estando mais expostos ao vector e provavelmente a prevenção aplicada poderá ser diferente.

A média de idades obtida neste estudo foi de 8 anos nos canídeos positivos a *E. canis* e não se observou qualquer relação entre a idade e o diagnóstico da doença, o que está de acordo com outros estudos (Harrus *et al.*, 2005).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a época do ano e a positividade a *E. canis*, que poderá ser explicado, por o vector estar presente ao longo de todo o ano (Silva *et al.*, 2006).

Verifica-se no entanto que a maioria das suspeitas tendem a ocorrer nos meses quentes, provavelmente devido às mesmas razões apontadas para a pesquisa de *Babesia canis*. A infecção por *E. canis* foi a que obteve a menor taxa de positivos, o que poderá revelar que nesta zona não é um agente frequente, quando comparado com os restantes.

Em relação ao género, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados estão de acordo com a literatura que refere não haver qualquer relação com o seu diagnóstico (Harrus *et al.*, 2005).

A raça também não revelou diferenças estatisticamente significativas no diagnóstico de *E. canis*. Os autores (Harrus *et al.*, 2005) referem o Pastor Alemão como sendo mais susceptível à infecção por *E. canis*. Neste estudo verificou-se que canídeos de raça obtiveram um maior número de suspeitas com 29, comparativamente com os de raças indeterminadas, apenas 14. As mesmas explicações apresentadas para a *B. canis* podem ser aplicadas na *E. canis* para explicar estes valores. As raças mais representativas neste estudo foram os canídeos sem raça definida e o Rottweiler, cada um com dois casos positivos. No Pastor Alemão recaíram 3 suspeitas, mas nenhuma revelou ser positiva, não sendo possível relacionar esta raça com o estudo referido anteriormente.

4.3. Rickettsiose Canina por *Rickettsia conorii*

Na amostra em estudo a proporção de canídeos infectados com *Rickettsia conorii* foi de 87%, semelhante ao obtido por Bacellar *et al.* (1995) em Setúbal, com 86%, em ambos por IFI, sugerindo uma possível endemia. Este valor foi superior ao obtido por Alexandre *et al.* (2011) em Portugal, com 62%, pelo mesmo teste e com amostra semelhante e outro realizado em Bragança por Figueiredo (2007) com uma prevalência de 55%. Estudos realizados em vários países da Europa, através de IFI, apresentaram resultados bastante inferiores, como Herrero *et al.* (1992), com 59% em províncias do centro de Espanha, Rojo (1997) em Léon, com 14%, Seguro-

Porta *et al.* (1998) perto de Barcelona, com 26%, Solano-Gallego *et al.* (2008) em Itália, com 0,4% no Norte, 1% no Centro e 3% no Sul e Menn *et al.* (2010) na Alemanha, com 35%, este último em cães de canis, sendo de esperar que fosse superior ou semelhante ao do presente estudo.

Em Portugal, um estudo preliminar realizado por Fonseca *et al.* (2012) estimou uma proporção de infecção por *Rickettsia* spp de apenas 5 a 36% nos ixodídeos analisados, através de qPCR, enquanto Milhano *et al.* (2010) obtiveram uma prevalência de infecção de *Rickettsia* spp de 55% também por PCR, no Safari Parque do Alentejo. Este último realizou a sequenciação de *Rickettsia* spp de modo a determinar as subespécies, mas nenhuma revelou *R. conorii*. Assim, seria útil a pesquisa específica de *R. conorii* nos ixodídeos de modo a determinar a sua taxa de infecção.

Tal como Delgado *et al.* (1995), o factor idade não se correlacionou com o seu diagnóstico.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o diagnóstico e a época, tal como Solano-Gallego *et al.* (2008b). Também para este agente, no entanto, se verifica uma superioridade de suspeitas nos meses quentes, embora a proporção de infectados em cada grupo seja semelhante. Este resultado vai no sentido oposto ao encontrado por Delgado *et al.* (1995) e Rojo (1997), em que obtiveram frequências superiores nos meses quentes da Primavera e Verão, ao contrário do obtido por Alexandre *et al.* (2011) com uma maior proporção de casos positivos entre Outubro e Dezembro. Mais uma vez a explicação poderá residir no facto do vector, *R. sanguineus* poder ser encontrado durante todo o ano (Silva *et al.*, 2006).

Relativamente ao género, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Este resultado não vai de encontro com o obtido por Green *et al.* (2006), que referem que os machos aparentam ter maior risco de infecção. As suspeitas recaíram, no entanto, uma vez mais, nos machos com 27, enquanto nas fêmeas foram 19, mas em proporção de animais infectados não há diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados são de difícil interpretação visto não estar disponível o número exacto de cães existentes nesta região e se a prevalência de machos versus fêmeas ser desigual à partida ou não. No entanto é plausível especular-se, visto ser esta uma zona de vivendas e haver uma preferência natural dos proprietários, por cães machos para a função de cão de guarda.

Também não se observaram diferenças significativas entre as raças e a infecção por *R. conorii*.

Os resultados obtidos são muito interessantes, pois comparativamente com os outros agentes a taxa de infecção por *R. conorii* é muito elevada. Curiosamente todos os animais deste estudo, testados no ano de 2011, foram positivos a este agente.

As análises efectuadas foram enviadas para dois laboratórios diferentes com iguais resultados, o que descarta em princípio um erro laboratorial. O meio de diagnóstico utilizado, o IFI, acarreta algumas limitações, nomeadamente o facto de pesquisar anticorpos que poderá apenas indicar que o animal contactou com o agente e este não estar, no momento da pesquisa, com infecção activa. A literatura refere que a pesquisa em áreas endémicas deve ser realizada através de testes mais específicos, como o WB, por detectar uma proteína antigénica específica, ou PCR, uma vez que pesquisa o agente etiológico e não o anticorpo (Babalís *et al.*, 1993).

A infecção por *R. conorii* é geralmente subclínica (Green & Breitschwerdt, 2006), e estes testes, ao contrário da leishmaniose são geralmente feitos em cães sintomáticos, pelo que é possível que: *i*) ocorram infecções concomitantes, tal como aconteceu em 14 canídeos deste estudo; *ii*) a possibilidade de reacções cruzadas na leitura dos IFI com outras espécies de *Rickettsia* spp; *iii*) e o grau de subjectividade subjacente dependente do observador.

Seria útil realizar-se este teste numa amostra de cães assintomáticos e sem infecções concomitantes de modo a avaliar a sua real incidência.

4.4. Leishmaniose Canina por *Leishmania infantum*

Na amostra em estudo foi obtida uma proporção de cães infectados de 28%, semelhante ao obtido por Maia *et al.* (2007) com 29% no Algarve e Cortes *et al.* (2007) em Lisboa, de 19%, pela mesma técnica. Também em Itália, pela mesma técnica, Pozio *et al.* (1981) obtiveram um valor semelhante, com 23,9%, provavelmente devido ao clima semelhante entre países. Este valor foi superior ao obtido, pelo mesmo teste, por Abranches *et al.* (1983) na região de Lisboa e Setúbal, com 10%, cuja explicação poderá ser a alteração do clima global, afectando a distribuição do vector e do agente (Kramer, 2008), ou devido à região e prevalência dos vectores em Cascais comparativamente com Lisboa e Setúbal. Também Brandonísio *et al.* (1992) em Itália, obtiveram um valor inferior, com 14,4%, provavelmente pelo mesmo motivo que o anterior.

A média de idades dos animais infectados foi de 8,5 anos. Tal como refere a literatura, a infecção ocorre com mais frequência nos animais mais velhos, como referiram Sousa *et al.* (2011) cuja prevalência da infecção foi superior nos adultos, Amela *et al.* (1995) que consideraram que os idosos e jovens adultos têm maior risco, Abranches *et al.* (1991) verificaram uma prevalência superior em canídeos com mais de 9 anos e Cortes *et al.* (2012) verificaram que cães entre os 5 e 8 anos apresentam maior risco de infecção.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação à época do ano e ao seu diagnóstico e mesmo o número de animais suspeitos foi muito semelhante ao longo de todo o ano. É provável que esta doença esteja a perder alguma sazonalidade, uma vez mais devido à alteração do clima global, afectando a distribuição do vector e do agente (Kramer, 2008), alargando por isso a época favorável dos flebótomos.

Em relação ao género, não se observaram diferenças estatisticamente significativas, tal como a literatura (Pozio *et al.*, 1981; Sideris *et al.*, 1996; Pereira, 2002; Cardoso *et al.*, 2004; Shang *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2011 e Cortes *et al.*, 2012).

As suspeitas foram no entanto muito superiores nos machos, com 125 contra 65 nas fêmeas. Estes resultados são de difícil interpretação uma vez que não está disponível o número exacto de cães existentes nesta região e se a prevalência de machos versus fêmeas é desigual à partida ou não. Mas, tal como referido para os restantes agentes, é plausível especular-se, visto ser esta uma zona de vivendas e haver uma preferência natural dos proprietários, por cães machos para a função de cão de guarda.

Em relação à raça, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, tal como Sousa *et al.* (2011). As suspeitas foram no entanto bastante superiores nos cães de raça com 133 casos, comparativamente com os cães de raças indeterminadas, com 57. A interpretação destes resultados fica dependente do conhecimento da prevalência de cães de raças puras comparativamente com os cães de raça indeterminadas na zona de Cascais. Sendo uma região com um nível sócio-económico mais elevado é possível que o número de cães de raça seja em número superior. De acordo com a literatura, como Abranches *et al.* (1991) os cães de raças, especialmente Doberman e Pastor Alemão são mais susceptíveis à doença. As raças autóctones são mais resistentes que as importadas (Ferrer 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2000) já Cortes *et al.* (2012) referem que canídeos sem raça definida pode ser um factor protector ao contrário das raças exóticas, que é de

risco. Curiosamente as raças mais representativas são todas raças de grande porte e muitas das quais associadas como sendo cães de exterior, estando por isso mais expostas ao vector.

5. Conclusão

No presente estudo, à semelhança de outros, foram obtidas proporções elevadas de agentes transmitidos por vectores em cães, nomeadamente Leishmaniose, Rickettsiose, Ehrlichiose e Babesiose. Os factores analisados não revelaram diferenças estatisticamente significativas no diagnóstico destes agentes.

Os resultados obtidos demonstraram que a pesquisa destes agentes não deve estar restringida aos meses quentes, mas sim durante todo o ano.

Este estudo pretende contribuir para um melhor conhecimento das hemoparasitoses que afectam o cão na zona de Cascais, por parte dos clínicos para que possam também sensibilizar os proprietários a realizar uma correcta profilaxia destas doenças.

No futuro, seria útil a pesquisa de outros agentes que ocorrem no País e nesta zona, como *A. phagocytophilum*, *A. platys* e *Dirofilaria immitis*, bem como tentar relacionar a profilaxia aplicada com a pesquisa de vários agentes, de modo a avaliar a sua eficácia.

Este tipo de estudos são fundamentais uma vez que contribuem para um melhor conhecimento dos agentes que ocorrem em Portugal, nomeadamente as zonas onde ocorrem, permitindo instituir uma melhor profilaxia consoante a sua ocorrência.

6. Bibliografia

Aboge O., Jia H., Terkawi A., Goo Y., Kuriki, K., Nishikawa Y, *et al.* (2007). A novel 57-kDa merozoite protein of *Babesia gibsoni* is a prospective antigen for diagnosis and serosurvey of canine babesiosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol*, 149,85-94

Abranches, P., Campino, L., Santos-Gomes, G. (1998). Leishmaniose canina, novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controlo da leishmaniose visceral humana. *Acta Média Portuguesa*. 10:507-511

Abranches, P., Conceição-Silva, M., Silva-Pereira, C. (1984). Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *J Trop Med Hyg*, 87(5),197-200

Abranches P., Lopes F., Silva F., Ribeiro M., Pires C. Kala-azar in Portugal III. (1983). Results of a survey on canine leishmaniasis performed in the Lisbon region. Comparison of urban and rural zones. *Ann Parasitol Hum Comp*, 58(4),307-15

Abranches, P., Pires, A., Conceição-Silva, M., Silva, D., Santos-Gomes,. (1987). O kala azar em Portugal. VI-Inquérito Epidemiológico realizado na região metropolitana de Lisboa: Interpretação da estrutura dinâmica do Foco Endémico. *J Ciências Médicas*, 151, 364-379

Abranches, P., Silva-Pereira, C.D., Conceição, F.M., Santos-Gomes, G.M., Janz, J.G. (1991). Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*, 77,557-561

Abranches, P., Sampaio-Silva, L., Santos-Gomes, M., Avelino, C., Pires, A., Conceição-Silva, M. *et al.* (1992). Kala-Azar in Portugal. Epidemiological survey in

Alijó (endemic region of Alto Douro. *Research and Reviews in Parasitology*, 52,121-124

Abranches, P., Santos-Gomes, G.M., Campino, L. (1993). Epidemiology of Leishmaniasis in Portugal. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 70,349-355

Adaszek, L., Winiarczyk, S. (2008). Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. *Vet Parasitol*, 152, 235–241

Afonso, M.O., Alves-Pires, C. (2002). *Capítulo II: Bioecologia dos vectores*. In Leishmaniose Canina. 1ª Edição Merial – Saúde Animal, Lda. Pag.27 -35

Afonso, M.O., Campino, L., Cortes, S., Alves-Pires, C. (2005). The Phlebotomine sandflies of Portugal. XIII- Occurrence of *Phlebotomus Sergenti* Parrot, 1917 in the Arrabida Leishmaniasis focus. *Parasite*, 12(1),69-72.

Aharonowitz, G., Koton, S., Segal, S., Anis, E., Green, S. (1999). Epidemiological Characteristics of Spotted Fever in Israel Over 26 Years. *Clin Infect Dis*, 29,1321-2

Alexandre-Pires, G; Correia, J. (2002). *Capítulo IV: Patogenia e lesões da leishmaniose canina*. In Leishmaniose Canina. 1ª Edição Merial – Saúde Animal, Lda. Pag.53-55

Alexandre, N., Santos, S., Nuncio, S., Sousa, R., Boinas, F., Bacellar, F. (2009). Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. *Vet J*, 181(3),343-4

Alexandre, N., Santos, S., Bacellar, F., Boinas, J., Núncio, S., Sousa, R. (2011). Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (*Canis familiaris*). *Ticks Tick Borne Dis*, 2(2),119-22

Alleman, A. (2005). The diagnosis and treatment of tick borne diseases in dogs. The North American Veterinary Conference – Proceedings of the NAVC, Orlando, Florida, 472-475

Amela, C., Mendez, I., Torcal, M., Medina, G., Páchon, I., Cañavate, C., Alvar J. (1995). Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain, *Eur J Epidemiol*, 11, 157-216

Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*, 57, 1-88

Alvar, J., Molina, R., San Andres, M., Tesouro, M., Nieto, J., *et al.* (1994). Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Hyg*, 88(4), 371-378

Alves-Pires, C., Campino, L., Afonso, M.O., Santos-Gomes, G., Dedet, J.P., Pratlong, F. (2001). The phlebotomines of Portugal. X-Natural infestation of *Phlebotomus perniciosus* by *leishmania infantum* MON-1 in Algarve. *Parasite*, 8(4),374-5

Amusategui, I., Tesouro, A., Kakoma, I., Sainz, A. (2008). Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from northwestern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8(6),797-803

Athanasiou, LV; Kontos, VI, Saridomichelakis MN, Rallis,TS, Diakou A. (2012) A cross-sectional sero-epidemiological study of Canine leishmaniasis in Greek mainland. *Acta Trop*, 122(3),291-5

Babalis, T., Dupont, T., Tselentis, Y., Chatzichristodoulou, C., Raoult, D. (1993). *Rickettsia conorii* in Greece: comparison of a microimmunofluorescence assay and western blotting for seroepidemiology. *Am J Trop Med Hyg*,48(6),784-92

Bacellar, C; Beati, L., França, A., Poças, J., Regnerry, R; Filipe, R. (1999). Israeli spotted fever *Rickettsia* (*Rickettsia conorii* complex) associated with human diseases in Portugal. *Emerg Infect Dis*, 5(6),835-836

Bacellar, F., Dawson, E., Silveira, A., Filipe, R. (1995). Antibodies against *Rickettsiaceae* in dogs of Setúbal, Portugal. *Cent Eur J Public Health*, 3(2),100-2

Baneth, G. (2006). Chapter 73 – Leishmaniasis. In: Craig E. Greene, C, *Infectious diseases of dogs and cats*. 3rd edition. Elsevier. Canada.

Baneth, G.(2010) *Canine Leishmaniasis*. 35th World Small Animal Veterinary Congress Geneva, Switzerland

Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*, 24(7),324-330

Beall, M., Alleman, A., Breitschwerdt, E., Cohn, L., Couto, G., Dryden, M., *et al.* (2012). Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. *Parasit & Vectors*,5:29

Beck, R., Vojta, L., Mrjak, V., Marinculić, A., Beck, A., Zivienjak, T., *et al.* (2009). Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int J Parasitol*, 39,843-848

Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D. *et al.* (1996). Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg*, 55(3),273-277

Bettini, S., Pozio, E., Gradoni, L. (1980). Leishmaniasis in Tuscany (Italy) (II): Leishmaniasis from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 74(1),77-83

Beugnet, F., Marié, J. (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol*, 163, 298-305

Birkenheuer, J., Neel, J., Ruslander, D., Levy, G., Breitschwerdt, B. (2004). Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in dog. *Vet Parasitol*, 124,151-160

Birkenheuer, J., Correa, T., Levy, G., Breitschwerdt B. (2005). Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003). *J Am Vet Med Assoc*, 227,942-947

Blanc, G., Caminopetros, J. (1932). Etudes épidémiologiques et expérimentales sur la fièvre boutonneuse, faites à l'Institut Pasteur d'Athènes. *Arch Inst Pasteur Tunis*, 343-94.

Boggiato, P., Gibson-Corley, K., Metz. K., Gallup, J., Hostetter, J., Mullin, K. *et al.* (2011). Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(4),1019

Boozer, A.L., Macintire, D.K. (2003). Canine babesiosis. *Vet Clin Small Anim*,33,885-904

Boozer, L. (2005). *Babesia gibsoni*: An emerging Pathogen in Dogs. Compendium. Auburn University

Bourdoiseau, G. (2006). Canine babesiosis in France. *Vet Parasitol*, 138, 118–125

Brandonisio, O., Carelli, G., Ceci, L., Consenti, B., Fasanella, A., Puccini, V. (1992). Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). *Eur J of Epidemiol*, 8(2),273-276

Brkljacić, M., Matijatko, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Rafaj B., *et al.* (2010). Molecular evidence of natural infection with *Babesia canis canis* in Croatia. *Acta Vet Hung*, 58(1),39-46.

Cabral, M., Grady, J., Gomes, S., Sousa, J., Thompson, H., *et al.* (1998). The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol*, 76, 173-180

Camacho, T., Pallas, E., Gestal, J., Guitià, J., Olmeda, S., Goethert, K. (2001). Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. *Vet Rec*, 149,552-555

Camacho, T., Pallas, E., Gestal, J., Guitián, J., Olmeda, S., Telford, R., *et al.* (2003). *Ixodes hexagonus* is the main candidate as vector of *Theileria annae* in northwest Spain. *Vet Parasitol*, 112,157-163

Camacho-Garcia, T. (2006). Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Vet Parasitol*, 138,97-102

Campino, L. (2002a). *Canine reservoirs and leishmaniasis: epidemiology and disease*. World Class Parasites. Vol, 4 Leishmania. Ed Farrel J Kluwer Academic Publisher. Boston/Dordrecht/London

Campino, L., Capela, R., Maurício, L., Ozenboy, S., Abranches, P. (1995). O Kala-Azar em Portugal. IX. A região do Algarve: Inquérito epidemiológico sobre o reservatório canino no concelho de Loulé. *Rev Port Doenç Infec*, 3-4,189-194

Campino, L., Maia, C. (2010). Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal. *Acta Med Port*, 23,859-864

Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., *et al.* (2006) Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop Med Int Health*, 11(11), 1708-14

Canine Vector-Borne Diseases. Acedido em 9 de Janeiro de 2012 às 12h29min em <http://cvbd.org>

Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y., *et al.* (2008a). *Babesia canis canis* and *B. canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Vet Parasitol*, 156,199-204

Cardoso, L., Mendão, C., Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD suspect dogs in Portugal – a national serological study. *Parasit Vectors*, 27,5,62

Cardoso, L., Neto, F., Sousa, J.C., Rodrigues, M., Cabral, M. (1998). Use of leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol*, 79(3),213-220

Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone J., Carreta, P., Varejão, E., *et al.* (2004a). Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Vet Parasitol*, 7;121,(1-2),21-32

Cardoso, L., Santos, H., Cordeiro-da-Silva, A., Pratlong, F., Dedet, JP., Rodrigues, M. (2002). *Leishmania infantum* MON-98: infection in a dog from Alto Douro, Portugal. *Acta Trop*, 83(1),83-5

Cardoso, L., Schallig, H.D., Neto, F., Kroon, N., Rodrigues, M. (2004b). Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop*, 91(2),95-100

Cardoso, L; Tuna, J; Vieira, L; Yisaschar-Mekuzas, Y; Baneth, G. (2008b). *Molecular detection of Anaplasma platys and Ehrlichia canis in dogs from the North of Portugal*. *Vet J*, 183:232-233.

Cardoso, L., Tuna, J., Yisaschar-mekuzas, Y., Baneth, G. (2010b). Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *Vet J*, 183(2),232-3

Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F., Costa, A., Machado, J., Diz-Lopes, D., *et al.* (2010a). Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasit Vectors*,3:27

Carlos, R., Carvalho, F., Wenceslau, A., Almosny, N., Albuquerque, G. (2011). Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. *Rev Bras Parasitol*, 20(3),210-4

Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Précigout, É., Moubri, K; *et al.* (1999). *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of three subspecies by restriction fragment length polymorphism analyses on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J Eukaryot Microbiol*, 46,298-303

Cassini, R., Zanutto, S., Frangipane, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A; *et al.* (2009). Canine piroplasmosis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Vet Parasitol*, 165,30-35

Castañeda, R., Carpio, I., Asensio, A., Alberdi, C., García, S., Dominguez, T., *et al.* (1999). Estudio de seroprevalencia de la leishmanosis canina en perros censados de Madrid. *Consulta*, 7,79-83

Claborn, M.D (2010). The Biology and Control of Leishmaniasis Vectors. *J Glob Infect Diseases*, 2(2),127-134

Coelho, S., Matos, A., Cardoso, L., Brancal, H., Martins, M. (2005). *Estudo sero-epidemiológico da leishmaniose canina na Região da Cova da Beira*. IX Congresso Ibérico de Parasitologia, Coimbra.

Cortes, S., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Campino, L. (2007). Stray dogs and Leishmaniasis in Urban Areas, Portugal. *Emerg Infect Dis*,13(9),1431-2

Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol*, 25

Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, C. (2003a). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in Southern Europe Part I: Epizootiological aspects. *Vet Parasitol*, 113,189-201

Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, C. (2003b). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from Southern Europe: a molecular study. *Vet Microbiol*, 93,307-317

Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J., Merino, S., Jefferies, R., *et al.* (2006). New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Vet Parasitol*,142,238-247

Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the Brown tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit & Vectors*, 3:26

Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Otranto, D. (2011). Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors*, 13,4,56

de Freitas, E., Melo, M.N., da Costa-Val, A.P., Michalick, S. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*, 137(1-2),159-67

de Sousa, R., Ismail, N., Dória-Nóbrega, S., Costa, P., Abreu, T., França, A., *et al.* (2005). The presence of eschars, but not greater severity, in Portuguese patients infected with Israeli spotted fever. *Ann N Y Acad Sci*, 1063:197-202

Delgado, S., Cármenes, P. (1995). Canine seroprevalence of *Rickettsia conorii* infection (Mediterranean spotted fever) in Castilla y León (northwest Spain). *Eur J*, 11(5),597-600

Di Cicco, F., Downey, E., Beeler, E., Marr., H; Cyrog, P., Kidd, L., *et al.* (2012). Re-emergence of *Babesia conradae* and effective treatment of infected dogs with atovaquone and azithromycin. *Vet Parasitol*, 8;187(1-2),23-7

Diakou, A., Papadopoulos, E., Lazarides, K. (2009). Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *J Feline Med Surg*. 11(8),728-730

Direcção Geral de Saúde. Doenças de Declaração obrigatórias de 2000-2006. Acedido em 2 de Maio de 2011 às 14:43 em <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008987.pdf>

Diz-Lopes, D., Rodrigues, T., Alves, S., Santos-Silva, M. (2005). Babesiose em Cão de Gado Transmontano. *Vet Tec*, 11:36

Duh, D., Tozon, N., Petrovec, M., Strasek, K., Avsic-Zupanc, T., *et al.* (2004) Canine babesiosis in Slovenia: molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet Res*, 35, 363–368

Dujardin, J., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J., Gradoni, L., Soteriadou, K., *et al.* (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniosis, Europe. *Emerg Infect Dis*, 14(7),1013-8

Espejo-Arenas, E., Font-Creus, B., Alegre-Segura, M.D., Segura-Porta, F., Bella-Cueto, F. (1990). Seroepidemiological survey of Mediterranean spotted fever in an endemic área ('Vallés Occidental', Barcelona, Spain. *Trop Geogr Med*, 42(3),212-6

Ferrer, M. (1999). Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick, R. (ed.): Canine leishmaniasis: An update. Proceedings of the Int. Can. Leishm. Forum, Barcelona, Spain, Intervet Int., Boxmeer, The Netherlands. 6-10

Figueiredo, D. (2007). MSc dissertation. Lisbon University, Faculty of Medicine. Estudo da prevalência de doenças associadas a vectores em canídeos domésticos do distrito de Bragança.

Fisa, R., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M., Valls, D., Serra, T., Colmenares, M., Castillejo, S., Portús, M., (1997). Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *J Vet Diagn Invest*, 9, 50–55.

Földvári, G., Hell, E., Farkas, R., *et al.* (2005) *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. *Vet Parasitol*, 127,221–226

Fonseca, I., Brito, M. (2002). *Capítulo VI: Diagnóstico*. 1ªedição Merial – Saúde Animal, Lda. Pag.87-91

Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Leal, A., Santos, A., Veloso, R., *et al.* (2012). Detecção de agentes de DTC em ixodídeos de Portugal. Symposium Merial. VIII Congresso Hospital Veterinário Montenegro

Franca-Silva, C., da Costa, T., Siqueira, M., Machado, L., da Costa, A., Mayrink; W., *et al.* (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of

Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*, 13(2-3),161-73

Garnham, C. (1965). The leishmanias, with special reference to the role of animal reservoirs. *Am Zool*. 5:141-151

Gilot, B., Laforge, L., Pichot, J., Raoult, D. (1990). Relationships between the *Rhipicephalus sanguineus* Complex Ecology and Mediterranean Spotted Fever Epidemiology in France. *Eur J Epidemiol.*, 6(4),357-362

Gray, S., Dautel H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., Lindgren, E. (2009). Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 593232.

Greene C.E., Breitschwerdt E.B. (2006). Chapter 29: Rocky Mountain spotted fever, murine typhuslike disease, Rickettsialpox, Typhus, and Q fever. In: Greene C, editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier; 2006. Pag 232-241

Greene, C.E., Straubinger, K.R. (2006). Chapter 45: Borreliosis. In Greene C, editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier

Hamel, L., Silaghi, C., Lescai, D., Pfister, K. (2012). Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. *Parasitol Res*,110(4),1537-45

Harrus, S. (2006). Chapter 28: Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis and Wolbachia Infection. In: Craig E. Greene, C. *Infectious diseases of dogs and cats*. 3rd edition. Elsevier. Canada. Pag 232-241

Harrus, S., Waner, T., Bjoerndorff, A., Shaw, S. (2005). Ehrlichiosis and anaplasmosis. In S.E. Shaw & M.J. Day. *Arthropod-borne infectious diseases of dog and cat*. Manson Publishing Ltd. Pag 120-126

Hartel, K., Rieker, T., Oehme, M., Brockmann, O., Muller, W., Dorn, N. (2007). First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 7(2),163-6

Herrero, C., Pelaz, C., Alvar, J., Molina, R., Vázquez, J; Anda, P., *et al.* (1992). Evidence of the presence of spotted fever group rickettsiae in dogs and dog ticks of the central provinces in Spain. *Eur J Epidemiol*, 8(4),575-9

Herrero-Herrero, I., Ruiz, R., Martin-Sanchez, M., Garcia, J. (1989). Mediterranean spotted fever in Salamanca, Spain. Epidemiological study in patients and serosurvey in animals and healthy human population. *Acta Trop*, 46,335–50.

Hervás, J., Méndez, A., Carrasco, L., Gómez-Villamandos, C. (1996). Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). *Vet Rec*,139(12),293-295

Hornok, S., Edelhofer, R., Farkas, R. (2006). Seroprevalence of canine babesiosis in Hungary suggesting breed predisposition. *Parasitol Res*, 99,638-642

Irwin, P. (2005). Babesiosis and cytauxzoonosis. In S.E. Shaw & M.J. Day. *Arthropod-borne infectious diseases of dog and cat*. Manson Publishing Ltd. Pag 63-77

Irwin, P. (2009). Canine babesiosis: *from molecular taxonomy to control*. *Parasit Vectors* 26,2,Sppl 1:S4

Irwin, P. (2007). Pups, PCRs and Platelets: *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections of dogs in Australia and overseas. Proceedings of WSAVA Congress, Sydney, Australia

Jambou, O., Marty, P., Jambou, R., Le Fichoux, Y., Haas, P., Jourdain, N., *et al.* (1986). Preliminary serological study on canine leishmaniasis in the Alpes-Martimes Department, France. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 80(4),666-7

Jefferies, R., Ryan, M., Levy, M., Breitschwerdt B., Irwin, J. (2003). Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. *J Parasitol*, 89,409-412

Jefferies, R., Ryan, M., Jardine, J., Broughton, K., Robertson, D., Irwin, J. (2007). Blood, bull terriers and babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Aust Vet J*, 85:459-463

Kelly, J., Matthewman, A., Mason, R., Courtney, S., Katsande, C., Rukwava, J. (1992). Experimental infection of dogs with a Zimbabwean strain of *Rickettsia conorii*. *J Trop Med Hyg*, 95(5),322–6

Keysary, A., Strenger, C. (1997). Use of enzyme-linked immunosorbent assay techniques with cross-reacting human sera in diagnosis of murine typhus and spotted fever. *Journal of Clin Microbiol*, 35(4),1034-5

Kidd, L., Maggi, R., Diniz, P., Hegarty, B., Tucker, M, Breitschwerdt, E. (2008). Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group *Rickettsia* in dog blood. *Vet microbiol*, 129(3-4),294 303.

Killick-Kendrick, R. (1999). Biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*, 17(3),279-289

Kirtz, G., Leschnik, M., Hooijberg, E., Tichys, A., Leidinger, E. (2012). In-clinic laboratory diagnosis of canine babesiosis (*Babesia canis canis*) for veterinary practitioners in Central Europe. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*, 24,40(2),87-94

Kjemtrup, M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, L., Carreno, A: (2006). *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Vet Parasitol*, 138,103-111

Kohn, B. (2008). *Anaplasma phagocytophilum* in dogs: prevalence and clinical aspects. CVBS Symposium, Germany, 16-19 April. Pag 38

Kramer, F. (2007). Um desafio para o médico veterinário – co infecção em cães por agentes patogênicos transmitidos por vectores. Canine Vector Borne Diseases “Digest”, 2ª edição, Bayer HealthCare, pp: 1-6

Kramer, F. (2008). Alterações climáticas – estão a abrir caminho para a expansão das CVBD?. Canine Vector Borne Diseases “Digest”. 3ª edição, pp:1-9

Kramer, F. (2009). Babesiose canina – uma história interminável. Canine Vector Borne Diseases “Digest”, 4ª edição, Bayer HealthCare, pp: 1-10

Kramer, F (2011). Hepatozoonose canina – um resumo para o médico veterinário. Canine Vector Borne Diseases “Digest”. 6º edição, pp:1-10

Lanotte, G., Rioux, A., Croset, H., Vollhardt, Y. (1975). Ecologie des leishmanioses dans le Sud de la France. VIII Complement a l'application épidémiologique de la technique d'immunofluorescence: les titres géométriques et arithmétiques moyens dans la leishmaniose canine. *Ann Parasitol Hum Comp*, 50(1),1-5

Leitner, M., Yitzhaki, S., Rzotkiewicz, S., Keysary, A. (2002). Polymerase chain reaction-based diagnosis of Mediterranean spotted fever in serum and tissue samples. *Am J Trop Med Hyg*, 67(2),166-9

Leschnik, M., Kirtz, G., Tichy, A., Leidinger, E. (2008). Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. *Int J Med Microbiol*, 298,243-248

Levin, L., Killmaster, F., Zemtsova, E. (2012). Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector borne Zoonotic Dis*, 12(1),28-33

Lledó, L., Giménez-Pardo, C., Dominguez-Peñafiel, G., Gegúndez, I., Casado, N., Criado, A., *et al.* (2010). Molecular detection of hemoprotozoa and *Rickettsia* species in arthropods collected from wild animals in the Burgos Province, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10,735-738

Maia, C., Afonso, M., Dionísio, L., Campino, L. (2007). Leishmaniasis survey in Algarve Region, Portugal: canine reservoir and phlebotomines and flies. X Congresso Ibérico de Parasitologia. Madrid. Espanha

Maia, C., Afonso, M., Neto, L., Dionísio, L., Campino, L. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *J Vector Borne Dis*, 46(4),268-272

Maia, C., Campino, L. (2008b). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*,158(4),274-287

Maia, C., Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir host of zoonotic leishmaniasis?. *Trends Parasitol*,8(4),555-9

Maia, C., Cristovão, M., Ramada, J., Rolão, N., Campino, L. (2006). Diagnóstico da leishmaniose canina pela técnica de PCR aplicada a sangue periférico em papéis de filtro – resultados preliminares. *Vet Med*, 8, 29-33

Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Rebêlo, E., Campino, L. (2010). Feline Leishmania infection in canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol*, 174(3-4),336-40

Maia, C., Nunes, M., Campino, L. (2008a). Importance of cats on zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8(4),555-560

Majláthová, V., Majláth, I., Víchová, B., Gul'ová, I., Derdáková, M., Sesztáková, et al. (2011). Polymerase chain reaction confirmation of *Babesia canis canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs suspected of babesiosis in Slovakia. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11(11),1447-51

Mancianti, F. (2004). Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat?. *Parassitologia*,46(1-2),203-206

Mancianti, F., Sozzi, S. (1995). Isolation of Leishmania from a new born puppy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89,402

Manelli, A., Mandola, M.L., Pedro, P., Tripoli, M., Nebbia, P. (2003). Associations between dogs that were serologically positive for *Rickettsia conorii* relative to the residences of two human cases of Mediterranean spotted fever in Piemonte (Italy). *Prev Vet Med*, 60(1),13-26

Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O., Altet, L. (2011). Canine leishmaniasis: the key point for Qpcr result interpretation. *Parasit Vectors*, 4:57

Martín-Sánchez, J., Guilvar, E., Acedo-Sánchez, C., Wolf-Echeverri, M., Sanchís-Marín, M.C., Morillas-Márquez, F. (1994). *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of *Leishmania infantum* complex in the Granada province (Southern Spain). *Int J Parasitol*, 24(3),405-408

Matjila, P., Penzhorn, L., Bekker, J., Nijhof, M., Jongejan, F. (2004). Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. *Vet Parasitol*, 122,119-125

Matjila, P., Nijhof, M., Taoufik, A., Houwers, D., Teske, E., Penzhorn, L., *et al.* (2005) Autochthonous canine babesiosis in The Netherlands. *Vet Parasitol*, 131, 23–29.

Matsumoto, K., Brouqui, P., Raoult, D., Parola, P. (2005). Experimental infection models of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group with *Rickettsia conorii*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 5(4),363–72.

McCall J.W., Genchi C., Kramer L.H., Guerrero J., Venco L. (2008). Heartworm disease in animals and humans. *Adv parasitol*, 66,193-285

Mellanby, J., Handel, G., Clements, N., Bronsvort, M., Lengeling, A., Schoeman, P. (2011). Breed and sex risk factors for canine Babesiosis in South Africa. *J Vet Intern M*, 25(5),1186-9

Menn, B., Lorentz, S., Naucke, T. (2010). Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors*, 3, 34

Mettler, M., Grimm, F., Naucke, T.J., Maasjost, C., Deplazes, P. (2005). Canine leishmanioses in Central Europe: retrospective survey and serological study of imported dogs and travelling dogs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 118(1-2),37-44

Milhano, N., Carvalho, L., Alves, S., Arroubé, S., Soares, J., Rodriguez, P., et al. (2010). Co-infections of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia lusitaniae* in ticks collected in a Safari Park, Portugal. *Ticks Tick Borne Dis*,1(4),172-7

Mohebali, M., Taran, M., Zarei, Z., (2004). Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Vet. Parasitol*, 121, 239–245

Moreno, J., Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*,18(9),399-405

Moreira, B., Luvizotto, R., Garcia, F., Corbett, P., Laurenti, D. (2007). Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmanioasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol*, 145, 245-252

Mylonakis, E., Siarkou, I., Leontides, L., Bourtzi-Hatzopoulou, E., Kontos, I., Koutinas, F. (2009) Evaluation of a serum-based PCR assay for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Microbiol*, 138(3-4):390-3.

Nalubamba, S., Hankanga, C., Mudenda, B., Msuku, M. (2011). The epidemiology of canine babesiosis infections in Zambia. *Prev Vet Med*, 1;99(2-4),240-4

Naucke, J., Lorentz, S. (2012) First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors*, 5(1),67

Neogy, A., Vouldoukis, J., Silva, O., Tselentis, Y., Lascombe, J., *et al.* (1992). Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am J Trop Med Hyg*, 47, 772–777.

Observatório Nacional das Leishmanioses. www.onleish.com
www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3 acessado em 21 Maio 2011 às 16h27

Oines, O., Storil, K., Brun-Hansen, H. (2010). First case of babesiosis caused by *Babesia canis* in a dog from Norway. *Vet Parasitol*, 4,171(3-4),350-3

Oliveira, L.C., Araújo, R.R., Alves, C.R., Mouta-Confort, E., López, J.A., Mendonça-Lima, F.W. (2010). Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*,43(4),400-404

Otranto, D., Dantas-Torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites Vectors*, 11;3:2.

Owens, D., Oakley, A., Marryott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, J; *et al.* (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusion from infected English foxhound to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 219(8),1076-1083

Oyamada, M., Davoust, B., Boni, M., Dereure, J., Bucheton, B., Hammad, A., *et al.* (2005). Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli* and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of Eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. *Clin Diagn Lab Immunol*,12,1343-1346

Palatnik-de-Sousa, C.B., Day, M.J. (2011). One health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors*, 4:197

Parola, P., Paddock, C., Raoult, D. (2005). Tick-borne disease rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev*, 18(4),719-756

Parola, P., Socolovschi, C., Raoult, D. (2009). Deciphering the relationships between *Rickettsia conorii* and *Rhipicephalus sanguineus* in the ecology and epidemiology of mediterranean spotted fever. *Ann N Y Acad Sci*,1166,49-54

Parola P., Socolovschi., Jeanjean L., Bitam I., Fournier E., Sotto A., *et al.* (2008). Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis*, 2,e338

Pereira, M. (2002). *Capítulo III: Epidemiologia da Leishmaniose canina*. In *Leishmaniose canina*. 1ªedição Merial – Saúde Animal, Lda. Pag.41 – 49

Pfeffer, M., Wölfel, R., Dobler, G. (2008). Rickettsia – a group of neglected pathogens. Proceedings of the 3th canine vector-borne Disease Symposium. Germany, 19-19 April 2008

Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernardina, W., Real, G., *et al.* (1994). Cellular and Humoral Immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*, 62(1), 229-235

Pires, A. (2000). Os flébotomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal. Tese de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa. Edição do autor, pp 237

Pires, C. (1984). Phlebotomus of Portugal. I-Natural infestation of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 and *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania* in the zoonotic focus of Arrabida (Portugal). *Ann Parasitol Hum Comp*, 59(5)521-4

Pires, A., Campino, L., Afonso, M.O., Santos-Gomes, G., Dedet, J.P., Pratlong, F. (2001). Les Phlébotomes du Portugal. X- Infestation naturelle de Phlébotomes perniciosus par *Leishmania infantum* MON-1 en Algarve. *Parasite*, 8(4),374-375

Pires, A., Santos-Gomes, M., Pratlong, F; Ribeiro, H., Campino, L., Abranches, P. (1991). Phlébotomes du Portugal. IV – Infestation naturelle de *Phlebotomus perniciosus* par *Leishmania infantum* MON-1 en Algarve. *Parasite*,8,374-375

Pozio, E., Gradoni, L., Bettini, S., Gramiccia, M. (1981). Leishmaniasis in Tuscany (Italy). VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop*, 38(4),383-393

Quinnell, J., Courtenay, S., Davidson, L., Garcez, B., Lambson, P., Ramos, J., *et al.* (2001). Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitol*, 122(3), 253-261

Raoult, D., Roux, V. (1997). Rickettsiosis as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 10, 694-719

Raoult, D., Toga, B., Dunan, S., Davoust, B., Quilici, M. (1985). Mediterranean spotted fever in the South of France; serosurvey of dogs. *Trop Geogr Med*, 37(3), 258-60

Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S., Jaffe, L. (1999). Analysis of immune responses in dogs with visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol*, 71(1), 69-76

Riera, C., Valladares, J.E. (1996). Viable *Leishmania infantum* in Urine and Semen in Experimentally Infected Dogs. *Parasitol Today*, 12(10), 412

Riera, C., Valladares, E., Gállego, M., Aisa, J., Castillejo, S., Fisa, R., *et al.* (1999). Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol*, 84(1-2), 33-47

Rioux, A., Albaret, L., Houin, R., Dedet, P., Lanotte, G. (1968). Écologie des leishmanioses dans le Sud de France. 2. Les réservoirs selvatiques. Infestation spontanée du renard (*Vulpes vulpes* L.). *Ann Parasitol Hum Comp*, 43(4), 421-428

Rioux, J.A., Aboulker, J.P., Lanotte, G., Killick-Kendrick, R., Martini-Dumas. (1985) Ecology of leishmaniasis in the south of France. 21. Influence of temperature on the

development of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, in *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Experimental study. *Ann. Parasitol. Hum.Comp*, 60(3),221-229

Rojo, J. (1997). Seroprevalence of the infections caused by *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in humans and dogs in primary health care of San Andreas del Rabanedo (Leon, Spain). *Rev Esp Salud Publica*, 71(2),173-80

Romero, L., Meneses, A., Salazar, L., Jiménez, M., Romero, J., Aguiar, M., et al. (2011). First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. *Res Vet Sci*,91(1),95-7

Roura, X. (2007). Diagnóstico de leishmaniosis. Livro de Ponencias Southern European Veterinary Conferencee, 42, Congresso Nacional AVEPA, 253-255

Rovero, C., Brouqui, P., Raoult, D. (2008). Questions on Mediterranean Spotted Fever a Century after Its Discovery. *Emerg Infect Dis*, 14(9),1360-7

Sager, H., Casati, S., Hartmeier, G., Sommer, B. (2005) Autochthonous case of canine babesiosis in the canton Solothurn. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 147, 259–265

Sampaio-Silva, L., Abranches, P., Campino, L., Avelino, I., Santos-Gomes, M., Seixas, A. (1993). Kala-Azar em Portugal VIII Estudo Epidemiológico da Leishmaniose canina em três concelhos do Alto-Douro. *Rev Port Doenç Infec*, 16,241-244

Santos, A., Alexandre, N., Sousa, R., Nuncio, M., Bacellar, F., Dumler, J. (2009). Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infections in dogs in Portugal suspected of having tick-borne disease. *Vet Tec*, 164,(6),168-71

Santos, S., Santos-Silva, M., Almeida, V., Bacellar, F., Dumler, S. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Ixodes ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Portugal Mainland. *Emerg Infect Dis*, 10,1643–1648

Santos-Gomes, G., Rodrigues, O., Marques, C. (2002). *Capítulo V: Resposta imunológica*. In Leishmaniose Canina. 1ª Edição Merial – Saúde Animal, Lda. Pag.69-70

Santos-Silva, M., Formosinho, P., Melo, P., Santos, A., Filipe, R. (2001). Ixodídeos (Acari: Ixodidae) parasitas de aves em Portugal. *Rev Port Ciênc Vet*, 96(540),11-3.

Santos-Silva, M., Sousa, R., Santos, S., Melo, P., Encarnação, V., Bacellar, F. (2006) Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. *Exp Appl Acarol*, 39,331–338

Santos-Silva, M., Beati, L., Santos, A., Sousa, R., Nuncio, M., Melo, P., *et al.* (2011). The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Exp Appl Acarol*, 55,85–121

Sasaki, E., Omobowale, O., Tozuka, M., Ohta, K., Matsuu, A., Nottidge, O., *et al.* (2007). Molecular survey of *Babesia canis* in dogs in Nigeria. *J Med Vet Sci*, 69,1191-1193

Schallig, H., Canto-Cavalheiro, M., Silva, E., (2002a). Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 1015–1018.

Schallig, H., Cardoso, L., Hommers, M., Kroon, C., Belling, G., Rodrigues, M., Semião-Santos, S., Vetter, H., (2004). Development of a dipstick assay for detection of *Leishmania*-specific canine antibodies. *J Clin Microbiol*, 42, 193–197.

Schallig, H., Schoone, G., Beijer, E., Kroon, C., Hommers, M., Ozbel, Y., Ozensoy, S., Silva, E., Cardoso, L., Silva, E., (2002b). Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet Parasitol*, 109, 1–8.

Segura-Porta, F., Diestre-Ortin, G., Ortuno-Romero, A., Sanfeliu-Sala, I., Font-Creus, B., Munoz-Espin, T., *et al.* (1998) Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in human beings and dogs from an endemic area of Mediterranean spotted fever in Catalonia, Spain. *Eur J Epidemiol*, 14(4), 395–8

Semião-Santos, S.J., Harith, A., Ferreira, E., Pires, C.A., Sousa, C., Gusmão, R. (1995). Évora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol Res*, 81(3) 235-9

Shang, L., Peng, W., Jin, H., Xu, D., Zhong, N., Wang, W., *et al.* (2011). The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in Sichuan Province, southwestern China detected by real time PCR. *Parasit Vector*, 4(1), 173

Shaw, S., Day, M. (2005). Arthropod-borne infectious diseases of dog and cat. Manson Publishing. UK. ISBN: 1-8407657-5. Pag. 63-70; 120-125

Shaw, E., Day, J., Birtles, B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol*, 17, 74-80

Sideris, V., Karagouni, E., Papadopoulos, G., Garifallou, A., Dotsika, E. (1996). Canine visceral leishmaniasis in the greater Athens area, Greece. *Parasite*. 3(2),125-130

Sikorski, E., Birkenheuer, J., Holowaychuk, K., McCleary-Wheeler, L., Davis, M., Littman, P. (2010). Babesiosis caused by a large *Babesia* species in immunocompromised dogs. *J Vet Intern Med*, 24,127-131

Silva, M., Santos, S., Formosinho, P., Bacellar, F. (2006). Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Med Port*, 19,39-48

Silva, I. (2011). Estudo de hemoparasitas transmitidos por vector, em cães de canil, Setúbal, Portugal. Dissertação de Mestrado. Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, pp 33-40;58

Simões, P., Cardoso, L., Araújo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G. (2011). Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs – First report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasit & Vectors*, 4,50

Solano-Galego, L., Hegarty, B., Espada, Y., Lull, J., Breitschwerdt, E. (2006b). Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* from blood of dogs in Italy. *Vet Microbiol*, 118,274-277

Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Di Marco, M., Caldin, M; Furnanello, T; *et al.* (2006a). Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs in Sicily. *Emerg Infect Dis*, 12(12),1985–8.

Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L. (2000). The ibizian hound presents a predominantly celular imune response against natural infection. *Vet Parasitol*, 90,37-45

Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, M., Ferrer, L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infections in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*, 39(2),560-563

Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., *et al.* (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg*, 76(4):676-80

Solano-Gallego, L. (2008c). What's new about canine and feline babesiosis?. Proceedings of the Southern European Conference & Congreso Nacional AVEPA, Barcelona, Spain, pp 1-6

Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., Furlanell, T. (2008a). *Babesia canis canis* and *B. canis vogeli* clinicopathological findings in DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet Parasitol*, 157,211-221

Solano-Gallego, L., Trotta, M., Caldin, M., Furlanello, T. (2008b). Molecular survey of *Rickettsia* spp. in sick dogs in Italy. *Zoonoses Public Health*, 55(8-10),521-5

Solcá, S., Guedes, E., Nascimento, G., Oliveira, G., Santos, L., Fraga, B., *et al.* (2012). Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Vet Parasitol*,23,184 (2-4),133-40

Sousa, C., Aldana, L., Correia, G., Silva, R., Leitão, R., Poiães-da-Silva, J. (1996). Contribuição para o estudo da leishmaniose canina na Lousã. Actas da III Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Parasitologia, pp 26

Sousa, S., Lopes, P., Cardoso, L., Silvestre, R., Schallig H., Reed, G., *et al.* (2011). Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. *Acta Trop*, 120(1-2),82-7

Sousa, R., Nóbrega, S., Bacellar, F., Torgal, J. (2003). Sobre a realidade da Febre escaro-nodular em Portugal. *Acta Med Port*, 16,429-436

Souza, M., Leal, C., Barboza, C., Uzêda, S., De Alcântara, C., Ferreira, F., *et al.* (2010). Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*,19(2),89-93

Stegeman, R., Birkenheuer, J., Kruger, M., Breitschwerdt, B. (2003). Transfusion associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 222,959-963

Stich, R., Schaefer, J., Bremer, W., Needham, G., Jittapalapong, S. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol*,20;158(4):256-273

Tabar, D., Francino, O., Altet, L., Sánchez, A; Ferrer, L., Roura, X. (2009). PCR survey of vector borne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniosis. *Vet Rec*, 164,112-116

Taboada, J., Lobetti, R. (2006). Chapter 77: Babesiosis. In: Craig E. Greene, C, *Infectious diseases of dogs and cats*. 3rd edition. Elsevier. Canada. 722-736

Tizard, I. (2004). Chapter 45: Acquired immunity to parasites. In: *Veterinary Immunology An introduction*. 7th edition. Saunders. Pág: 293-296

Tomás, A., Romão, S. (2002). *Capítulo II: Biologia do parasita*. In Leishmaniose Canina. 1ªedição Merial – Saúde Animal, Lda. Pag.18

Torina, A., Caracappa, S. (2006). Dog tick-borne diseases in Sicily. *Parassitologia*, 48(1-2),145-7

Trapp, M., Dagnone, S., Vidotto, O., Freire, L., Amude, M., Morais, S. (2006). Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Vet Parasitol*, 10,140(3-4),223-230

Trotta, M., Carli, E., Novari, G., Furlanello, T., Solano-Galego, L. (2009). Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. *Vet Parasitol*, 12;165(3-4),318-22

Vides, P; Schwardt, T.F; Sobrinho, S., Marinho, M., Laurenti, D., Biondo, W., *et al.* (2011) *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*, 178(1-2),22-8

Xavier, S., Andrade, H., Haddad, S., Chiarelli, I., Lima, W., Michalick, M., *et al.* (2006). Comparison of paraffinembedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detecting *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet. Res*, 2, 17.

World Health Organization for Animal Health. (1980).Studies on leishmaniasis vectors/reservoirs and their control on the Old World: Part II. Middle East. WHO. Geneva

World Health Organisation for Animal Health. (2008). Chapter 2.1.8 – Leishmaniosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012. Volume 1

Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., Cornelissen, W. (2001). Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. Review. *Vet Parasitol*, 95(1),1–15

Wardrop, K., Reine, N., Birkenheuer, A., Hohenhaus, A., Crawford, C., Lappin, M. (2005). Canine and Feline Blood Donor Screening for Infectious Disease. Association of Veterinary Hematology and Transfusion Medicine. *J Vet Inter Med*, (19),135-142

Yeagley, J., Reichard, V., Hempstead, E., Allen, E., Parsons, M., White, A; *et al.* (2009). Detection of *Babesia gibsoni* and the canine small Babesia `Spanish isolate` in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations. *J Am Vet Med Assoc*, 1;235(5),535-539

Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., Gothe, R. (2000) Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet Parasitol*, 89,241-248

Zerpa, O., Ulrich, M., Borges, R., Rodriguez, V., Centeno, M., Negron, E., *et al.* (2003). Epidemiological aspects of human and canine leishmaniasis in Venezuela. *Rev Panam Salud Publica*, 13(4),239-45

Zhi, X., Le Blancq, S., Evans, A., Peters, W. (1984). The characterization by isoenzyme electrophoresis of *Leishmania* isolated in the people's Republic of China. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 78(5),689-693